



UNIVERSITE DE LILLE

Ecole doctorale Biologie – Santé

Thèse Pour l'obtention du grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Spécialité : Histologie

Présentée par Anne-Laure Barbotin

**Plasticité neuro-structurale de l'hypothalamus dans le syndrome des ovaires
polykystiques**

Soutenue publiquement le 11 décembre 2019 devant le jury composé du :

Dr. Yves Tillet	Directeur de Recherche, Tours, France	Président
Dr. Nathalie di Clemente	Directeur de Recherche, Paris, France	Rapporteur
Pr. Patrice Jissendi Tchofo	PU-PH, Université de Bruxelles, Belgique	Rapporteur
Pr. Sophie Catteau-Jonard	PU-PH, Université de Lille, France	Examineur
Dr. Paolo Giacobini	Directeur de Recherche, Lille, France	Examineur
Pr. Didier Dewailly	PU-PH, Université de Lille, France	Directeur de Thèse
Dr. Valérie Mitchell	MCU-PH, Université de Lille, France	Invitée

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'équipe 2 « Développement et plasticité du cerveau neuroendocrine » de l'UMR-S 1172 Inserm -Université Lille -CHU de Lille

Directeur d'équipe : Monsieur le **Docteur Vincent Prévot**

Sous la direction scientifique de
Monsieur le **Docteur Paolo Giacobini**

A Monsieur le **Docteur Yves Tillet** et à Madame le **Docteur Nathalie Di-Clemente**. Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. Je suis honorée de votre présence dans mon jury. Vos domaines d'expertise respectifs permettront j'en suis sûre de faire émerger de nouvelles perspectives à ce travail. J'espère que celui-ci sera à la hauteur de vos attentes.

A Monsieur le **Professeur Patrice Jissendi-Tchofo**. Je souhaite vous remercier à plusieurs titres. Je vous remercie tout d'abord d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail ainsi que pour votre participation durant ces 3 années lors des comités de suivi de thèse. Votre expertise et votre bienveillance ont permis de faire évoluer ce travail.

A Madame le **Professeur Sophie Catteau-Jonard**. Je te remercie infiniment d'avoir accepté de juger ce travail mais surtout pour ton implication dans l'étude clinique IRM-SOPK dans l'inclusion de l'intégralité des patientes du protocole. Sans ton aide, ce travail n'aurait pas pu aboutir et je t'en suis extrêmement reconnaissante.

A Monsieur le **Docteur Paolo Giacobini**. Je te remercie d'avoir supervisé ce travail et de m'avoir accompagné professionnellement durant ces dernières années. Merci encore pour ton accueil au sein de l'équipe. C'est un grand plaisir de travailler avec toi quotidiennement. Merci également pour ta disponibilité, pour la rigueur dont tu as fait preuve ayant permis l'aboutissement de ce travail. Merci pour tes grandes qualités humaines.

A Monsieur le **Professeur Didier Dewailly**. Je vous remercie encore d'avoir accepté sans hésitation d'être mon directeur de thèse. J'ai eu à plusieurs reprises l'occasion d'apprécier votre esprit critique, votre expertise et vos qualités humaines. Vos conseils éclairés m'ont été d'une aide précieuse dans l'aboutissement de ce travail.

A Madame le **Docteur Valérie Mitchell**. Je vous remercie pour avoir accepté de co-encadrer cette thèse pendant 3 années bien sûr mais surtout pour votre écoute, votre bienveillance, et d'avoir partagé avec moi votre expérience et vos connaissances. Merci encore également pour vos qualités humaines et pour votre soutien dans l'aboutissement de mon parcours professionnel. Je vous remercie également pour nos échanges tant sur le plan professionnel que personnel qui ont permis de me faire progresser et votre disponibilité en toutes circonstances. Je vous remercie également de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ses travaux de thèse dans de bonnes conditions en me dégageant de nombreuses activités hospitalières.

A Vincent Prévot. Je tiens à te remercier de m'avoir accueilli dans ton équipe. Merci également pour ta disponibilité sans faille pour les parties techniques sur les prélèvements d'éminences médiane. Merci également pour nos échanges le midi. J'espère pouvoir travailler dans ton équipe encore longtemps

Au Pr Pascal Pigny. Je vous remercie de votre collaboration active dans ce projet.

A Gregory Kuchcinski. Je tiens à te remercier pour ta grande implication dans le protocole d'IRM, pour ta gentillesse et ta disponibilité. A Fabien Bertrand et au Dr Nawal Waucquier. Je vous remercie pour votre soutien et votre implication dans les inclusions du protocole dont les débuts n'ont pas été toujours faciles.

A Danièle. Merci pour ta patience dans la recherche des explants d'éminence médiane parfaits pour la microscopie électronique.

A Anne. Merci pour tes précieux conseils, ta disponibilité et ton soutien.

Un grand merci à Sarah Gallet. Grâce à toi, la culture primaire des tanocytes n'a maintenant plus de secrets pour moi (ou presque ...). A Gaëtan, pour ta patience au quotidien devant mon incompatibilité avec tout type de matériel informatique... A Mégane, pour ta bonne humeur et ton coaching matinal sur la rédaction de ma thèse. A Marion, pour ta gentillesse et ton aide dès que j'en avais besoin. A Sam, Giuliana, Mauro, Manon Duquesne, Sara Trova, Valérie Leysen, Daniela pour leur soutien, leur patience, leur disponibilité en toute circonstance.

A Maeliss, pour avoir partagé ses 3 années de thèse avec moi, mais aussi les multiples étapes de préparation de dossiers pour le CNU, après le CNU, avant nomination... Ta présence à mes côtés a été une aide précieuse !

A Nour. Merci pour ton soutien indéfectible, pour ton amitié. Merci de m'avoir toujours remonté le moral. Passer ses 3 années de thèse à tes côtés a été plaisir. Tes conseils aussi bien que ta bonne humeur en toute circonstance m'ont aidé à progresser et à concilier vie professionnelle et vie familiale. J'espère que nous continuerons à travailler ensemble encore longtemps.

Merci à toute l'équipe des techniciens de l'IBDR-Spermiologie-CECOS pour leurs sourires et les petits déjeuners du vendredi matin !

Un grand merci à Brigitte Leroy, qui m'a soutenu et motivé en toutes circonstances. Merci encore d'avoir accepté de me dégager le temps nécessaire à l'accomplissement de cette thèse. Un grand merci également à Laura Keller, Valérie Lefebvre, Bérengère Ducrocq, Audrey Uk, Marie Cardey pour leur soutien et l'aide que vous m'avez apporté en assurant les activités hospitalières.

Je tiens également à remercier sincèrement le Pr Claude-Alain Maurage pour m'avoir soutenue tout au long de mon parcours universitaire et Ariane Sharif pour nos échanges hebdomadaires concernant l'enseignement de l'histologie.

Je garde toujours le meilleur pour la fin, donc merci infiniment
A ma famille bien sûr et spécialement à mes parents et mes grands-parents,
A ma belle-famille,
A mon mari Stéphane,
Pour leur patience au quotidien mais encore plus ces dernières semaines,
Et enfin, à mes enfants Chloé et Manon pour leurs sourires et leurs bêtises

ABRÉVIATIONS

AMH : Hormone anti-mullérienne
AMHR2 : AMH récepteur 2
AMPA : acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
AR: androgen receptor
ARNm: ARN messagers
ARH: noyau arqué
ASRM: American Society for Reproductive Medicine
AVPV: noyau antéroventral périventriculaire
CBG : Corticosteroid-Binding Globulin
CIC : centre d'investigation clinique
CREAT: créatine
DENDD1A: DENN/MADD domain containing 1A
DHT: dihydrotestosterone
ER: estrogen receptor
ESHRE: European Society of Human Reproduction and Embryology
FAI: index d'androgène libre
FSH: follicle stimulating hormone
GABA: acide gamma-aminobutyrique
GWAS: genome-wide association study
EM: eminence médiane
eNOS: oxide nitrique synthase endothéliale
GnRH : Gonadotropin releasing hormone
GPR54: G-Protein Coupled Receptor 54
HA : hyperandrogénie
hCG : hormone chorionique gonadotrope humaine
HPG : axe hypothalamo-hypophysaire gonadique
IMC : indice de masse corporelle
IRM : imagerie par résonance magnétique
KA: kaïnate
KNDy: kisspeptine- / neurokinine B- / dynorphine

KISS: kisspeptine
Kiss1R: kiss 1 receptor
iNOS: oxide nitrique synthase inductible
LH: Luteinizing hormone
MIS: substance Müllérienne inhibitrice
NAA: N-Acétyl-aspartate
NIH: National Institute of Health
NMDA: N-méthyl-D-aspartate
NO: monoxyde d'azote
NOS : oxyde nitrique synthase
OA : oligo-anovulation
PeN : noyau péri-ventriculaire
PCOM : aspect d'ovaires polykystiques
PR: progesteron receptor
QPCR: quantitative polymerase chain reaction
SEMA3A: sémaphorine 3A
SEMA7A: sémaphorine 7A
SHBG: sex hormone binding protein
SOPK : Syndrome des ovaires polykystiques
T: testostérone
TE: temps d'écho
TGFβ: transforming growth factor beta
TN : nerf terminal
TP : propionate de testostérone
TR : temps de relaxation
VNN : nerfs voméro-nasaux

RESUME

L'hormone anti-Müllérienne (AMH) dont les taux dans le sérum sont élevés dans le Syndrome des Ovaires Polykystiques (SOPK) est connue pour augmenter la sécrétion de LH/GnRH. Comme mis en évidence récemment, cette augmentation de la sécrétion de GnRH pourrait être liée à une hyperactivité des neurones à GnRH en réponse à une action directe de l'AMH mais pourrait également s'exercer indirectement via une augmentation des afférences excitatrices sur les neurones à GnRH. Par ailleurs, les tanocytes, qui enchâssent les terminaisons des neurones à GnRH, expriment le récepteur à l'AMH et sont connus pour moduler la plasticité neuro-structurale de l'hypothalamus. Ainsi, notre objectif est de tester les deux hypothèses suivantes dans un modèle animal et chez la femme. Est-ce que la physiopathologie du SOPK : 1- Est liée à une rétraction des tanocytes provoquée par l'AMH, entraînant l'augmentation des sécrétions de GnRH / LH ? Et/ou 2- Est liée à une augmentation de l'activité des neurones à GnRH AMH-dépendante ?

Nous avons étudié la modification de la plasticité morphologique de l'hypothalamus en microscopie électronique en comparant la distance entre les terminaisons des neurones à GnRH et l'espace péri-capillaire entre des éminences médianes de rates en phase de diœstrus de leur cycle œstral (au moment où ces terminaisons sont normalement enfouies par les tanocytes) traitées par de l'AMH et des contrôles. Puis, nous avons comparé cette même distance entre des éminences médianes issues d'un modèle de souris SOPK en comparaison à des contrôles. Enfin, nous avons étudié la plasticité neuro-structurale de l'hypothalamus chez des femmes SOPK et des témoins par une approche en imagerie en comparant les métabolites cérébraux.

Nous avons observé une augmentation significative du nombre de terminaisons de neurones à GnRH situées à proximité de l'espace péri-capillaire dans le groupe traité par l'AMH par rapport aux contrôles et nous avons fait les mêmes observations chez les souris SOPK comparées aux contrôles. Par ailleurs, nous avons mis en évidence une augmentation de l'activité neuronale dans le noyau arqué de l'hypothalamus chez des souris SOPK. Or, cette région est particulièrement impliquée dans la régulation de la sécrétion de GnRH. Chez les femmes atteintes de SOPK, nous avons pour la première fois mis en évidence des concentrations plus élevées de GnRH mesurées par spectroscopie de masse par rapport à des

femmes normo-ovulantes. Notre étude par IRM, chez les femmes SOPK et contrôles, vient conforter ce résultat en montrant une augmentation de la viabilité/activité neuronale. Cette étude translationnelle suggère que l'augmentation des sécrétions de GnRH/LH rencontrées dans le SOPK serait dépendante d'une part d'un rapprochement de terminaisons à GnRH à l'espace péri-capillaire et d'autre part d'une augmentation de l'activité neuronale hypothalamique.

ABSTRACT

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common reproductive disorder (10% of women worldwide). Anti-Müllerian hormone (AMH) levels are found to be 2-3-fold higher in PCOS women than in those with normal ovaries. AMH induces LH secretion by stimulating the activation of GnRH secretion. As recently demonstrated, this increase in GnRH secretion could be related to hyperactivity of GnRH neurons in response to a direct action of AMH but could also be exerted indirectly via an increase in excitatory inputs on GnRH neurons.

Our team has previously demonstrated that tanycytes, which unsheath the terminals of GnRH neurons, regulate GnRH secretion and express AMH receptor. Thus, we aim to determine (1) whether elevated AMH could be responsible for the retraction of the tanycyte coverage leading to increased GnRH/LH secretion in PCOS and (2) whether neuronal hyperactivity in hypothalamus could contribute to higher GnRH activity in PCOS women.

Firstly, we have performed ultrastructural studies in rodents' median eminence (ME) explants challenged with AMH. Then, we compared tanycytic retraction using electron microscopy. We have performed the same experiments in a PCOS mouse model. In humans, we have used metabolic magnetic resonance imaging approaches (i.e. proton magnetic resonance spectra). In order to assess neuronal activity, we have compared N-acetyl-aspartate/creatine ratios in the hypothalamus between PCOS women versus controls.

Using electron microscopy, we have shown that tanycytes displayed a significant retraction of their end-feet after AMH treatment *ex vivo*. This is followed by the sprouting of GnRH terminals towards the pericapillary space. Such processes could significantly favor the sustained delivery of peak levels of GnRH, which could contribute to the rise in LH levels typical of PCOS condition. We have found the same results in PCOS-mouse model with higher GnRH terminals towards the pericapillary space in PCOS mice than in controls.

In addition, we found an increase in neuronal activity in the arcuate nucleus of the hypothalamus in PCOS mice. Moreover, this region is particularly involved in the regulation of GnRH secretion. For the first time, we have demonstrated that PCOS women exhibit higher concentrations of GnRH measured by mass spectroscopy than GnRH levels in normo-ovulatory women. Our proton magnetic resonance spectroscopy analysis has revealed that PCOS women exhibit higher N-acetyl aspartate/creatine ratio than controls. These results are predicted to be correlated with increased hypothalamic activity.

This translational study suggests that the increase in GnRH / LH secretions found in PCOS could be explained by neurostructural hypothalamic plasticity in link with tanycytes retraction and by an increase of neuronal activity in the hypothalamus.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	15
CHAPITRE 1 : Le contrôle de la reproduction.....	16
1. L'axe hypothalamo-hypophysaire gonadique	17
2. La GnRH	20
2.1. Ontogenèse des neurones à GnRH.....	21
2.2. Rôle de la GnRH à l'âge adulte	21
3. Neuromodulation de la sécrétion de GnRH	22
4. Autres molécules impliquées dans le contrôle de la reproduction	24
4.1. La kisspeptine	24
4.2. Le glutamate.....	27
4.3. Le GABA	28
4.4. Le monoxyde d'azote.....	29
4.5. L'AMH	29
5. Plasticité de l'hypothalamus.....	34
5.1. Rôle des cellules gliales dans le contrôle de la libération de GnRH.....	38
5.2. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les interactions neurone – glie associées à la régulation de la GnRH.....	40
5.3. Rôle des sémaphorines dans la modulation de la plasticité de l'hypothalamus	41
CHAPITRE 2 : Le syndrome des ovaires polykystiques	44
1. Critères diagnostiques	45
2. Présentation clinique du SOPK	48
2.1. L'hyperandrogénie clinique.	48
2.2. L'hyperandrogénie biologique.	50
2.3. Oligo-anovulation	51

2.4. Pathologies associées et complications dans le SOPK	52
3. Prise en charge du SOPK	53
3.1. Modification du mode de vie.	53
3.2. Traitements médicamenteux	53
3.3. Chirurgie bariatrique.	54
4. Origine du SOPK	55
4.1. Causes génétiques	55
4.2. Causes épigénétiques	56
4.3. Le SOPK, une pathologie neuroendocrinienne.....	57
4.4. Autres populations neuronales impliquées dans le SOPK.....	61
4.5. Apport des modèles animaux dans la connaissance de la physiopathologie du SOPK	
63	
OBJECTIFS	71
MATÉRIEL ET MÉTHODES	74
1. Animaux	75
2. Culture cellulaire	76
3. Traitement prénatal des souris gestantes par l'AMH (PAMH).....	77
4. Injection de Tat-Cre et isolement des tanocytes par tri cellulaire	77
5. Polymerase Chain Reaction quantitative (qPCR)	78
6. Immunohistochimie.....	79
7. Western Blot.....	80
8. Évaluation des changements ultra structuraux dans l'hypothalamus induits par l'AMH.	81
9. Évaluation des changements ultra structuraux dans l'hypothalamus chez les animaux SOPK.....	83
10. Étude clinique chez la femme SOPK	83
10.1. Plan expérimental :.....	83
10.2. Acquisition d'images	86

10.3. Analyse spectrale.....	86
11. Analyses statistiques.....	87
RÉSULTATS	88
1. Expression de l'AMH et de l'AMHR2 par les tanocytes.....	89
2. Modification de la plasticité de l'hypothalamus par l'AMH	92
3. Plasticité hypothalamique dans le SOPK.....	96
4. SOPK et hyperactivité neuronale	101
5. Le SOPK chez les femmes et hyperactivité de l'hypothalamus	104
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	109
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	115
ANNEXES	145

SOMMAIRE DES FIGURES ET TABLEAUX

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : Le contrôle de la reproduction

Figure 1 : Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	18
Figure 2 : Variations hormonales au cours du cycle menstruel.....	19
Figure 3 : Représentation schématique des noyaux hypothalamiques chez l'homme et la souris (B).	23
Figure 4 : Représentation schématique de la régulation de la sécrétion de la GnRH par les neurones à kisspeptine chez la souris.....	26
Figure 5 : Représentation schématique de la voie de signalisation de l'AMH.....	31
Figure 6 : Représentation schématique du mode d'action de l'AMH dans l'ovaire.....	32
Figure 7 : Représentation schématique du mécanisme d'action proposé de l'AMH sur les neurones à GnRH des femmes à ovaire normal et des femmes avec un syndrome des ovaires polykystiques (SOPK).	33
Figure 8 : Représentation schématique des tanocytes.....	35
Figure 9 : Localisation des tanocytes et des épendymocytes avec des cils battants dans la région tubérale de l'hypothalamus.....	36
Figure 10 : Représentation schématique des types cellulaires (tanocytes, astrocytes et cellules endothéliales) et des terminaisons neuronales présents au niveau de l'éminence médiane de l'hypothalamus.....	38
Figure 11 : Représentation schématique soulignant les changements morphologiques des pieds tanocytaires au cours des différentes phases du cycle œstral chez le rongeur.....	39
Figure 12 : Coordination entre les cellules gliales, neuronales et endothéliales régulant la sécrétion de GnRH au cours du cycle œstral.....	42

CHAPITRE 2 : Le syndrome des ovaires polykystiques

Tableau 1 : Classifications utilisées pour le diagnostic de SOPK.....	46
Figure 1 : Critères diagnostiques et phénotypes dans le SOPK.....	46
Figure 2 : Score de Ferriman Gallway modifié.....	49

Figure 3 : Représentation schématique de la biodisponibilité de la testostérone.....	50
Figure 4 : Représentation schématique des conséquences d'un taux élevé d'AMH dans le SOPK.....	58
Tableau 2 : Synthèse des différents modèles animaux de SOPK.....	66
Figure 5 : Sites d'action hypothétiques d'action des récepteurs aux androgènes (AR) impliqués dans le développement des caractéristiques du SOPK.....	67
Figure 6 : Programmation prénatale du SOPK par l'AMH.....	68

MATERIEL ET METHODES

Figure 1 : Relation entre les concentrations d'hormones circulantes, le stade du cycle œstral et les résultats cytologiques des frottis vaginaux tout au long du cycle chez la souris.....	76
Figure 2 : Représentation schématique du protocole d'injection d'AMHc conduisant au modèle de souris SOPK appelé modèle « PAMH ».....	77

RESULTATS

1. Expression de l'AMH et de l'AMHR2 par les tanocytes

- **Figure 1a** : Schéma représentatif du modèle expérimental permettant l'isolement de tanocytes pour la réalisation de la PCR quantitative.....89
- **Figure 1b** : Analyse par PCR quantitative de l'expression des transcrits de l'Amh, amhr2, Alk2, Alk3, et de l'Alk6 par des tanocytes triés.....90
- **Figure 1c-f** : Expression de l'AMH et de l'AMHR2 dans l'hypothalamus de souris femelles adultes *in vivo*.....91
- **Figure 1g** : Western blot mettant en évidence l'expression de l'AMH et de l'AMHR2 dans l'éminence médiane de rats et par des tanocytes issus de culture primaire.....91
- **Figure 1h** : Expression de l'AMH et de l'AMHR2 *in vitro* (culture primaire de tanocytes).....92

2. Modification de la plasticité de l'hypothalamus par l'AMH

- **Figure 2a** : Modèle expérimental permettant d'évaluer si la plasticité de l'EM est AMH-dépendante.....93

- **Figure 2b** : Microphotographies montrant des terminaisons de neurones à GnRH marquées aux billes d'or (issues d'explants d'éminence médiane de rates en diœstrus traitées ou non avec de l'AMH).....94
- **Figure 2c** : Analyse comparative du pourcentage de terminaisons de neurones à GnRH situés à moins de 1µm de l'espace péri-capillaire entre des EM traitées par de l'AMH et des EM incubées avec une solution tampon PBS.....95
- **Figure 2d** : Analyse comparative de la surface occupée par les tanocytes entre des EM traitées par de l'AMH et des EM incubées avec une solution tampon PBS.....96

3. Plasticité de l'hypothalamus dans le SOPK

- **Figure 3a** : Microphotographies montrant des terminaisons de neurones à GnRH marquées aux billes d'or (en bleu) issues d'explants d'éminence médiane de souris PAMH ou contrôles en diœstrus.....97
- **Figure 3b** : Analyse comparative du pourcentage de terminaisons de neurones à GnRH situés à moins de 1µm de l'espace péri-capillaire entre des souris PAMH et des souris contrôles.....98
- **Figure 3c** : Analyse comparative de la surface occupée par les tanocytes entre les souris PAMH et les souris contrôles.....98
- **Figure 3d**: Corrélation entre le pourcentage de terminaisons à GnRH situées à moins de 1µm de la lame basale et le pourcentage de surface recouverte par les tanocytes.....99
- **Figure 3e** : Microphotographies montrant des terminaisons de neurones à GnRH marquées à l'or colloïdal issues d'explants d'éminence médiane de souris PAMH ou contrôles en diœstrus.....100
- **Figure 3f** : Analyse comparative du nombre moyen de grains d'or par terminaison à GnRH rapportée à la surface en µm² entre les souris PAMH et les souris contrôles...100

4. SOPK et hyperactivité neuronale

- **Figure 4a** : Immunomarquage pour la kisspeptine et le c-fos dans le noyau arqué....102
- **Figure 4b** : Analyse comparative du nombre de neurones c-Fos entre des souris témoins et des souris PAMH dans la région du noyau arqué.....103
- **Figure 4c** : Analyse comparative du nombre de neurones à kisspeptine entre des souris témoins et des souris PAMH dans la région du noyau arqué.....103

- **Figure 4d** : Analyse comparative du nombre de neurones co-exprimant le c-Fos et la kisséptine entre des souris témoins et des souris PAMH dans la région du noyau arqué.....104

5. Le SOPK chez les femmes et hyperactivité de l'hypothalamus

- **Tableau 1** : Caractéristiques cliniques et hormonales des patientes SOPK et témoins inclus.....105
- **Figure 5a** : Localisation du voxel utilisé pour l'analyse en spectroscopie au niveau de l'hypothalamus en coupe coronale et sagittale.....105
- **Figure 5b** : Analyse comparative des ratios de métabolites de N-acétyl-aspartate/créatine entre femme témoins et femmes SOPK.....106
- **Tableau 2** : Profil hormonal des patientes témoins et SOPK ayant bénéficié d'un dosage de GnRH.....107
- **Figure 5c** : Analyse comparative des dosages de GnRH entre femmes témoins et SOPK.....107
- **Figure 5d** : Corrélation entre la concentration de GnRH et la concentration d'AMH.108

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : LE CONTROLE DE LA REPRODUCTION

1. L'axe hypothalamo-hypophysaire gonadique

La fonction de reproduction et la fertilité sont sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire gonadique (HPG) et en particulier des neurones à gonadolibérine (GnRH) qui représentent le chef d'orchestre du système reproductif. Ces neurones sont dispersés dans l'hypothalamus et s'organisent en réseau.

Les neurones à GnRH représentent une petite population de neurones dispersés dans le cerveau antérieur rostral, en contact avec des afférences neuronales et des cellules gliales environnantes, qui vont transmettre des signaux hormonaux, métaboliques, circadiens [1]. Ces neurones envoient de longues projections au niveau de l'éminence médiane, où le neuropeptide sera libéré de manière pulsatile dans le système porte hypophysaire. Cette sécrétion pulsatile conditionne la libération des gonadotrophines, l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH), par les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse. La fréquence des impulsions de GnRH détermine quel type de gonadotrophine sera préférentiellement sécrété. Ainsi une fréquence de sécrétion de GnRH rapide favorise la sécrétion de LH, tandis qu'une fréquence plus lente favorise la sécrétion de FSH [2]. Les deux gonadotrophines hypophysaires LH et de FSH vont agir au niveau périphérique sur les gonades. Chez la femme, elles agissent sur l'ovaire pour réguler deux événements : la folliculogenèse et la stéroïdogénèse. En retour, l'ovaire élabore des hormones stéroïdiennes sexuelles, telles que les œstrogènes, les progestatifs et les androgènes, qui établissent à leur tour un rétrocontrôle sur l'hypothalamus et l'hypophyse, créant ainsi une boucle de rétroaction homéostatique régulant les sécrétions de GnRH, de LH et de FSH (Figure 1).

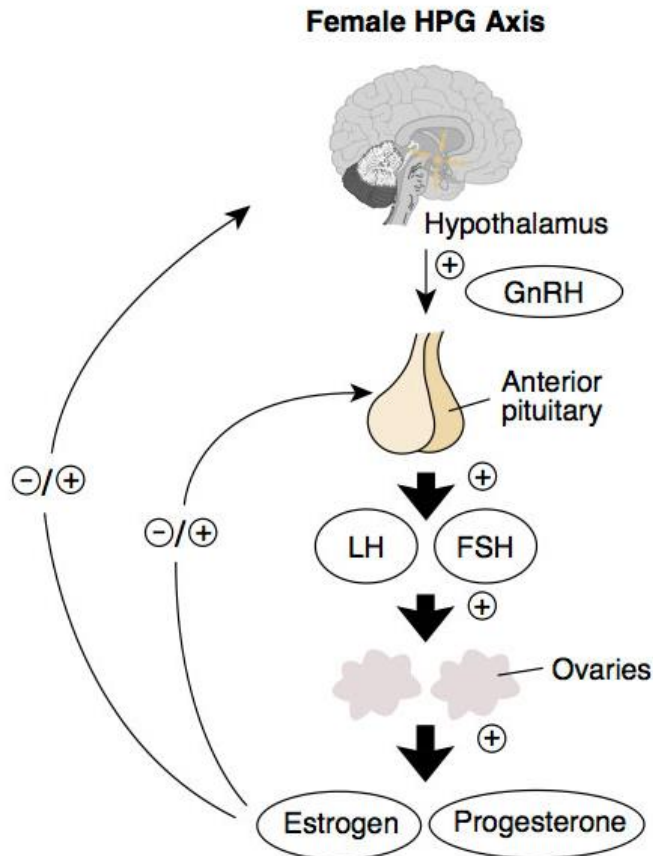


Figure 1 : Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophysaire

Chez une femme en bonne santé, la fréquence et l'amplitude de la libération de GnRH subissent des changements cycliques au cours du cycle menstruel en réponse à un mécanisme de rétrocontrôle par les stéroïdes ovariens [3,4]. Au cours de la 1^{ère} partie du cycle, en milieu de phase folliculaire, le rétrocontrôle de l'œstradiol augmente la fréquence des impulsions de GnRH tout en réduisant son amplitude [5]. L'augmentation de la fréquence de la GnRH stimule la stéroïdogénèse ovarienne, puis l'augmentation des taux d'œstradiol provoque un basculement du rétrocontrôle négatif vers un rétrocontrôle positif. Ceci aboutit à une augmentation de la libération de GnRH et de LH au milieu du cycle, responsable du déclenchement de l'ovulation. Après l'ovulation, l'augmentation de la progestérone élaborée par le corps jaune exerce une activité inhibitrice sur les neurones à GnRH (réduction de leur pulsativité) via un rétrocontrôle négatif (Figure 2). Ces changements dynamiques dans le schéma de libération de GnRH sont essentiels pour produire les taux appropriés de

gonadotrophines nécessaires au développement folliculaire et à l'ovulation. De la fréquence de la sécrétion de la GnRH dépendra la sécrétion préférentielle de FSH ou de LH. Ainsi, une fréquence rapide de sécrétion de la GnRH (1pulse/heure) provoque la sécrétion des chaînes α et de la chaîne β de la LH ; au contraire une fréquence lente de sécrétion favorisera la synthèse et la sécrétion de la chaîne β de la FSH. L'importance de la pulsativité de la GnRH a été mise en évidence chez des singes rhésus. Alors que l'administration continue de GnRH à des singes ovariectomisés dont la sécrétion de GnRH endogène avait été abolie par radiofréquence, ne permettait pas de restaurer la sécrétion de gonadotrophines, l'administration intermittente de GnRH permettait de rétablir des niveaux normaux de sécrétions de gonadotrophines [6].

Une stimulation continue de la GnRH (par l'utilisation d'un analogue de la GnRH par exemple) entrainera une diminution de la sécrétion de FSH et de LH, secondaire à une désensibilisation des récepteurs à GnRH hypophysaire [6]. Par ailleurs, la demi-vie de la GnRH est très courte, de l'ordre de quelques minutes seulement.

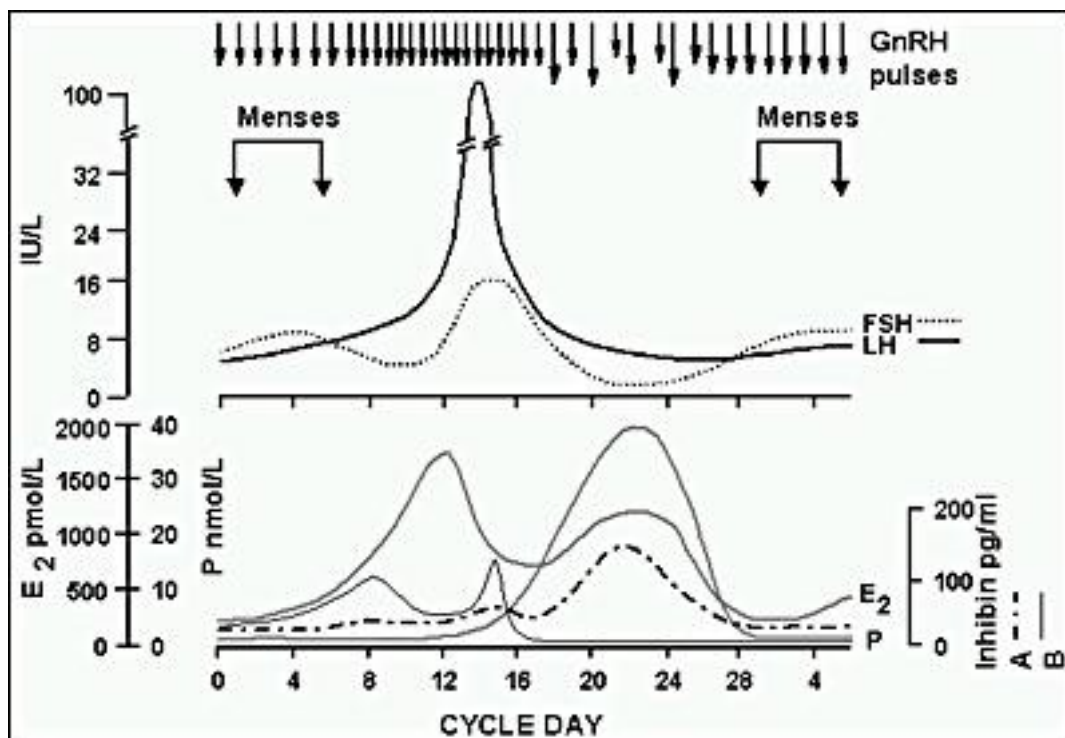


Figure 2 : Variations hormonales au cours du cycle menstruel. Adapté de Marshall *et al* [7]

2. La GnRH

La GnRH est un décapeptide (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) [8] dont la découverte dans l'hypothalamus porcin et la description de sa structure remonte à 1977 grâce aux travaux de deux prix Nobel Andrew Schally et Roger Guillemin. Initialement appelé LHRH en raison de sa capacité à stimuler la sécrétion de LH, le nom de GnRH fut finalement retenu car ce neuropeptide est également capable de stimuler la sécrétion de FSH.

Plusieurs travaux ont notamment démontré que la sécrétion de la GnRH était pulsatile et corrélée aux pulses de LH libérés par l'antéhypophyse [9–11]. Il existe en réalité deux modes distincts de sécrétion de GnRH: un mode de sécrétion pulsatile et un mode de sécrétion par pic [12]. Le mode pulsatile se réfère à la libération épisodique de GnRH, où il existe des pulses de sécrétion de GnRH dans la circulation portale avec des concentrations indétectables de GnRH pendant l'intervalle entre les pulses. Le pic de sécrétion de GnRH se produit chez la femme en période pré-ovulatoire au cours de laquelle la présence de GnRH dans la circulation portale semble persistante [12,13].

Trois types de système à GnRH ont été identifiés grâce à des techniques de clonage. Le système à GnRH de type I, généralement hypothalamique, est spécifique d'espèce. Il a été identifié chez les mammifères, les oiseaux, les amphibiens et les poissons, et il est impliqué dans les fonctions reproductives. Les neurones à GnRH de type I prennent naissance au niveau de la placode nasale au cours du développement embryonnaire, puis ils migrent dans l'hypothalamus en suivant les voies olfactives et les axones voméro-nasaux [14,15]. Il a été montré que des anomalies de la migration des neurones à GnRH ou de la sécrétion de GnRH de type I étaient responsables d'infertilité [16,17]. Le système à GnRH de type II est également retrouvé chez les vertébrés, il est considéré comme une forme ancienne de GnRH. La GnRH-II est exprimée dans le noyau supra-optique, paraventriculaire, suprachiasmatique et dans l'hypothalamus médio-basal. Le système à GnRH de type III a été isolé plus récemment chez la lamproie, il présente une grande homologie avec le système à GnRH des mammifères, à l'exception de quatre acides aminés (en position 5 à 8). La présence de plusieurs formes de GnRH suggère un changement génique au cours de l'évolution. Cependant chez les mammifères, les fonctions gonadotropes sont limitées à la GnRH de type I; par conséquent, la GnRH de type I est communément appelée GnRH chez l'humain [18].

2.1. Ontogenèse des neurones à GnRH

Les neurones à GnRH prennent naissance au niveau des placodes olfactives, puis migrent vers le cerveau antérieur (dont une partie deviendra l'hypothalamus) en suivant le trajet des nerfs olfactifs, voméro-nasaux (VNN) et du nerf terminal (TN). Ainsi l'ontogenèse des neurones à GnRH et du système olfactif sont intimement liées. Ce lien étroit est retrouvé en pathologie humaine dans le syndrome de Kallmann de Morsier. Cette dysplasie olfacto-génitale, est liée à un défaut de développement du système olfactif et de la migration des neurones à GnRH. Par conséquent, on retrouve dans ce syndrome l'association d'un hypogonadisme hypogonadotrope et d'une anosmie.

2.2. Rôle de la GnRH à l'âge adulte

La libération de la GnRH se produit au niveau de l'éminence médiane dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Elle court-circuite donc la circulation générale, afin d'atteindre de manière plus directe et plus efficace les récepteurs à GnRH situés sur les cellules gonadotropes de l'adénohypophyse. La GnRH stimule la synthèse et la sécrétion de la FSH et de la LH par l'antéhypophyse. La GnRH est sécrétée de manière pulsatile.

Les neurones à GnRH ont une forme bipolaire, avec de longs axones étendus leur permettant d'atteindre la région de l'éminence médiane située distance. Leur projection axonale est particulière, car elle possède des épines dendritiques sur toute leur surface, qui conduisent activement les potentiels d'action. C'est pour cette raison que certains groupes les ont appelés les «Dendron» [19,20]. Il a été observé que le nombre d'épines dendritiques augmentait à la puberté [21] indiquant une modification de la plasticité de leurs axones. Cette plasticité est nécessaire pour maintenir l'augmentation des entrées synaptiques qui accompagnent la maturité et la synchronisation des sécrétions [20]. En effet, avant la puberté, la pulsativité de la GnRH est faible, et c'est l'augmentation de la pulsativité de la GnRH (sous l'effet de l'intégration de données relatives à la balance énergétique via l'action de la leptine) qui est responsable de la mise en place de la puberté [22].

3. Neuromodulation de la sécrétion de GnRH

Les œstrogènes occupent une place essentielle dans le contrôle de la fonction de reproduction. Chez la femme, la principale source d'œstrogènes est représentée par les ovaires et les cellules de la granulosa. Les œstrogènes proviennent de la conversion des androgènes sécrétés par les cellules thécales. Cette conversion est le fait d'une enzyme, l'aromatase exprimée par les cellules de la granulosa. Chez les femmes, les stéroïdes ovariens favorisent l'acquisition des caractères sexuels secondaires et la régulation du cycle menstruel [23].

De plus, les œstrogènes agissent aussi spécifiquement (mais de manière indirecte) au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus pour moduler la sécrétion de la GnRH. L'œstradiol étant une hormone stéroïdienne, elle est capable de passer à travers les membranes phospholipidiques cellulaires, pour se fixer à des récepteurs nucléaires aux œstrogènes alpha ($ER\alpha$) et bêta ($ER\beta$). Après fixation, le signal est transduit en se liant à des éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) qui régulent la transcription des gènes cibles au niveau nucléaire [24]. Des études dans des modèles murins de souris invalidées pour les récepteurs aux œstrogènes $ER\alpha$ et $ER\beta$ ont fourni des preuves cruciales pour comprendre les fonctions biologiques de ces récepteurs [25,26]. Ces deux récepteurs n'ont pas la même fonction dans la transmission des rétrocontrôles. Alors que les souris Knock-out (KO) pour l' $ER\alpha$ sont stériles (confirmé par une absence de corps jaune dans les ovaires) et présentent un utérus hypoplasique et des taux élevés de testostérone [26–28], les souris KO pour $ER\beta$, ont une fertilité normale ou altérée à des degrés variables [26,28,29].

Le rétrocontrôle des œstrogènes sur l'hypothalamus s'exerce selon un schéma bimodal. Au cours du cycle œstral, lorsque les taux plasmatiques de 17 β -œstradiol, sont faibles, le rétrocontrôle est inhibiteur, les œstrogènes inhibent la sécrétion de GnRH et maintiennent une pulsativité de la GnRH basse [30]. Alors qu'en période pré-ovulatoire, lorsque la sécrétion d'œstradiol augmente (en lien avec la présence de follicules pré-ovulatoires), l'œstradiol est responsable d'une stimulation des neurones à GnRH (rétrocontrôle positif) [9]. Cette rétroaction positive se produit en fin de la phase folliculaire chez la femme et dans l'après-midi du præstrus chez le rongeur [30,31]. Les œstrogènes, une fois dans l'hypothalamus vont activer les neurones à GnRH et augmenter la sécrétion du décapeptide. Puis l'augmentation de la

GnRH va être à l'origine d'une augmentation de la LH, qui permettra de déclencher l'ovulation [5,32].

Cependant, le rétrocontrôle exercé par les hormones stéroïdiennes (et donc par les œstrogènes) est limité au niveau des neurones GnRH eux-mêmes à l'existence du récepteur aux œstrogènes de type Beta ($ER\beta$) [33].

En effet, les neurones à GnRH n'expriment pas les récepteurs responsables indispensable aux boucles de rétrocontrôle que sont les récepteurs aux œstrogènes de type alpha ($ER\alpha$) [34], ni les récepteurs à la progestérone (PR) [35], ou aux androgènes (AR) [36].

Ainsi, la majorité des rétroactions exercées par les hormones stéroïdiennes sur les neurones à GnRH se produisent de manière indirecte via le réseau neuronal afférent des neurones à GnRH, sensible aux hormones stéroïdiennes. Plusieurs régions du cerveau semblent particulièrement impliquées, notamment le noyau périvericulaire antéroventral (AVPV), le noyau périvericulaire (PeN) et le noyau arqué (ARH) [37–39].(Figure 3)

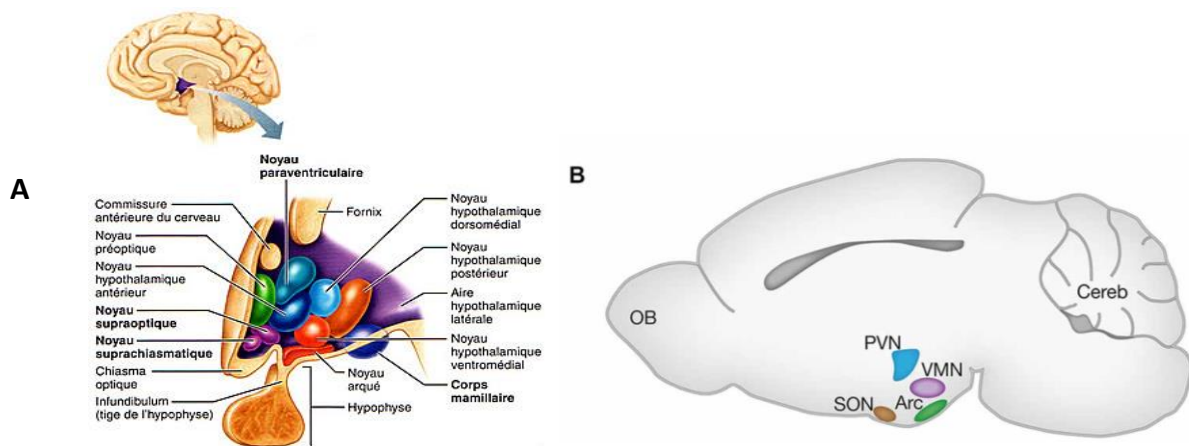


Figure 3 : Représentation schématique des noyaux hypothalamiques chez l'homme (A) et chez la souris (B). D'après Biran *et al* [40] Arc : noyau arqué, OB : bulbe olfactif, PVN : noyau paraventriculaire, SON : noyau supra-optique, VMN : noyau ventéromédian

Des études chez le mouton [38], le rat [39] et la souris [37] ont montré que la région du noyau arqué était particulièrement impliquée dans le rétrocontrôle négatif de la progestérone et des œstrogènes. Bien que les populations neuronales spécifiques qui assurent la médiation du rétrocontrôle inhibiteur des hormones stéroïdiennes sur les neurones à GnRH ne soient pas complètement définies, l'implication de neurotransmetteurs classiques, tels que le glutamate et

le GABA, ainsi que des neuropeptides, comme la kisspeptine, a été largement démontré [41–43].

4. Autres molécules impliquées dans le contrôle de la reproduction

Comme cité précédemment, le rétrocontrôle des œstrogènes implique différentes régions anatomiques de l'hypothalamus, incluant le noyau arqué, l'AVPV et le noyau péri-ventriculaire. Or, on retrouve notamment dans ces régions des neurones à Kisspeptine exprimant le récepteur spécifique ER α .

4.1. La kisspeptine

La kisspeptine est un puissant régulateur de l'activité des neurones à GnRH. En plus d'exprimer les récepteurs spécifiques aux estrogènes (ER α), les neurones à Kisspeptine expriment aussi les récepteurs à la progestérone et aux androgènes, témoignant de leur implication dans les boucles de rétrocontrôle de la libération de la GnRH par les hormones stéroïdiennes [44–46].

La kisspeptine est un neuropeptide essentiel au déclenchement de la puberté et à la fertilité (de [47–49]). La voie de signalisation de la kisspeptine passe par son récepteur GPR54 ou Kiss1R (maintenant appelé Kiss 1 receptor), qui est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé une protéine G. Ce récepteur est présent dans la plupart des neurones à GnRH [50]. La fixation de la kisspeptine à son récepteur entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium dans les neurones à GnRH, responsable d'une dépolarisation et d'une augmentation de la sécrétion de GnRH. (revue par Herbison *et al* 2010, [51]).

La kisspeptine a été découverte en 1996 comme étant un peptide ayant la propriété d'inhiber le potentiel métastatique des mélanomes. Ce n'est qu'en 2003, que le rôle essentiel de la kisspeptine dans le mécanisme de contrôle de la reproduction et du contrôle de la sécrétion de GnRH a été découvert par deux équipes indépendantes. Ces équipes ont mis en évidence des mutations homozygotes dans le gène codant pour le GPR54 responsables d'une perte de fonction chez des sujets atteints d'un hypogonadisme hypogonadotrope isolé sans anosmie. Ces

mêmes déficits gonadotropes ont également été rapportés chez des patients porteurs d'une mutation pour la kisspeptine elle-même [52].

De la même manière, la fonction de ce gène a été confirmée dans un modèle animal de souris KO pour le récepteur à la kisspeptine GPR54 [47]. L'inactivation de ce gène empêchaient les souris (quel que soit le sexe) de faire leur puberté, les rendant ainsi stériles confirmant ainsi le rôle de la kisspeptine dans la régulation de la GnRH [48,53]. A noter que des taux normaux de GnRH ont été retrouvés chez les souris mutées pour le gène GPR54 suggérant que la synthèse de la GnRH n'était pas altérée mais qu'il s'agissait d'un dysfonctionnement dans le contrôle de la libération de GnRH [48].

Par ailleurs, il a été mis en évidence que l'injection centrale (intra-ventriculaire) ou périphérique (sous cutanée, ou veineuse) de kisspeptine stimulait la sécrétion de gonadotrophine chez la plupart des espèces, y compris les rongeurs [54–57]. Cette stimulation de la sécrétion des gonadotrophines s'exerce de façon indirecte via une augmentation de la libération de GnRH, comme en témoigne l'augmentation des taux de GnRH dosés dans le liquide céphalorachidien des brebis injectées par la kisspeptine [58]. L'effet indirect du neuropeptide sur les gonadotrophines via une action sur les neurones à GnRH a été confirmée par une étude ayant montré que l'utilisation d'un antagoniste de la GnRH de manière concomitante à la kisspeptine empêchait son action [59].

Grâce à des techniques utilisant l'hybridation *in situ* et l'immunohistochimie, deux populations distinctes de neurones à kisspeptine ont pu être identifiées. Ces 2 populations sont situées dans le noyau antéroventral périventriculaire (AVPV) et le noyau arqué (ARH) chez les rongeurs [54,60,61]. Chez l'homme, ces neurones sont situés dans la région pré-optique et le noyau infundibulaire (ce dernier étant l'équivalent du noyau arqué chez les rongeurs) [62].

Les œstrogènes modulent l'activité de la kisspeptine de manière négative et positive en fonction de la région hypothalamique concernée. Il a été suggéré que les populations neuronales situés dans le noyau arqué étaient responsables du rétrocontrôle négatif, tandis que les neurones à kisspeptine situés dans l'AVPV (dans l'aire pré-optique) transmettaient la rétroaction positive des oestrogènes [37,45,63,64] (Figure 4).

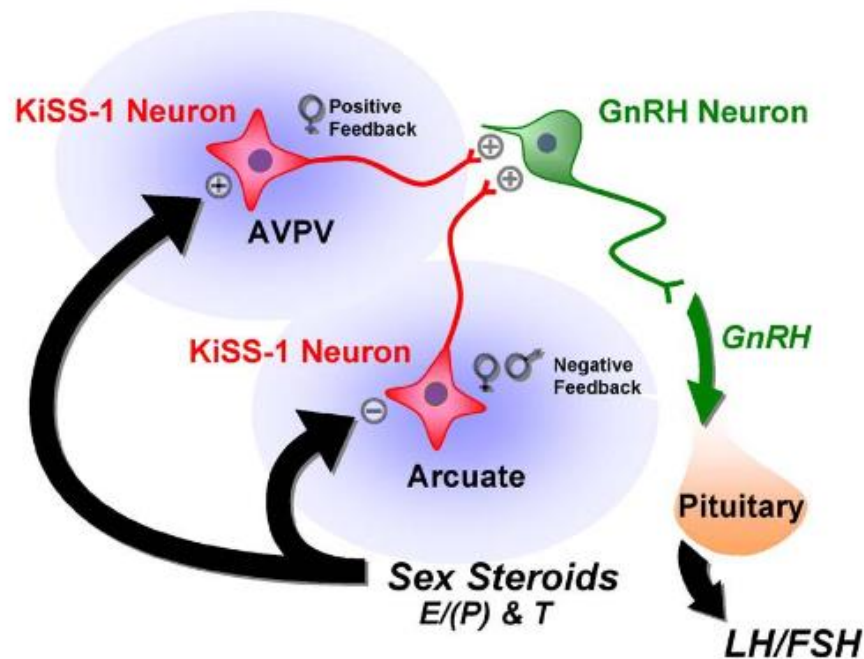


Figure 4 : Représentation schématique de la régulation de la sécrétion de la GnRH par les neurones à kisspeptine chez la souris. D'après Oakley *et al.* et Gottsch *et al.* [65,66]. La Kisspeptine stimule la sécrétion de GnRH par un effet direct sur les neurones de la GnRH, dont la plupart expriment les récepteurs à la kisspeptine, *Kiss1r*. Les neurones à kisspeptine de l'ARH (arcuate) semblent être impliqués dans la régulation du rétrocontrôle négatif de la GnRH / LH par les stéroïdes sexuels. L'œstradiol (E), la progestérone (P) et la testostérone (T) inhibent l'expression des ARNm de la kisspeptine dans le noyau arqué. Ces mêmes hormones induisent l'expression des ARNm de la kisspeptine dans l'AVPV. Les neurones à kisspeptine de l'AVPV seraient donc impliqués dans la régulation du rétrocontrôle positif de la GnRH / LH.

En effet, il a été observé une augmentation des taux d'ARN messagers (ARNm) codant pour la kisspeptine dans la région de l'ARH après la castration d'animaux (rongeurs et ovins). Au contraire, une diminution des ARNm a été observée dans l'aire pré-optique chez le rongeur après castration. Par ailleurs, la supplémentation par des stéroïdes sexuels permet de rétablir des niveaux normaux après castration [45,63]. Ces variations d'ARNm sont corrélées à la concentration du peptide [67]. Les neurones à kisspeptine de l'AVPV semblent donc être le centre intégrateur du rétrocontrôle positif des œstrogènes responsables de l'augmentation de l'activité des neurones à GnRH conduisant au pic de LH, comme en témoigne le fait que

l'injection d'un anticorps anti-kisspeptine dans l'AVPV empêche le pic pré-ovulatoire de LH [68].

Les neurones à kisspeptine situés dans l'AVPV envoient des axones en apposition étroite avec le péricaryon des neurones à GnRH pour réguler la montée de la GnRH chez les rongeurs [69], tandis que la population située dans l'ARH contacte les axones de la GnRH au niveau de l'éminence médiane pour moduler la pulsativité de la GnRH [70]. Par ailleurs, il a été montré que la quantité de neurones à kisspeptine était sexuellement dimorphique dans certaines régions du cerveau. En effet, un nombre plus élevé de neurones à kisspeptine est retrouvé dans l'AVPV de souris femelles en comparaison avec les souris mâles [60].

Par ailleurs, les populations neuronales de l'ARH et de l'AVPV sont également différentes par leur contenu en neurotransmetteur. En effet, la majorité des neurones situés dans l'ARH coexpriment deux autres neuropeptides que sont le neurokinine B et la dynorphine. Cette population est ainsi plus communément appelée neurones « KNDy » pour kisspeptine- / neurokinine B- / dynorphine. La neurokinine a un rôle excitateur sur la libération de LH tandis que la dynorphine joue un rôle inhibiteur. La dynorphine pourrait également agir de manière paracrine sur les neurones KNDy de l'ARH pour moduler la sécrétion de la kisspeptine [71].

4.2. Le glutamate

Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur classique. Il s'agit du neurotransmetteur le plus fréquemment utilisé par les neurones du système nerveux central. Son action est transmise par différents types de récepteurs : des récepteurs ionotropes et des récepteurs métabotropes. Les récepteurs ionotropes AMPA (acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique) / kaïnate (KA), et N-méthyl-D-aspartate (NMDA) sont des canaux ioniques qui agissent en modulant le passage des cations. Ils sont présents au niveau postsynaptique et transmettent généralement une réponse rapide [72]. Les récepteurs métabotropiques agissent quant à eux via l'activation d'une protéine G sensible à la libération de calcium intracellulaire ou via la modulation de l'activité adénylate-cyclase [72].

Le glutamate pourrait jouer un rôle important dans la modulation de l'activité des neurones à GnRH. En effet, les neurones à GnRH expriment à la fois les récepteurs ionotropes et métabotropiques au glutamate. Ces récepteurs sont exprimés par les corps cellulaires, et les

terminaisons des neurones à GnRH [20,73]. Les neurones à GnRH expriment les 3 types de récepteurs ionotropes : AMPA, NMDA, et les récepteurs de type KA. Le site d'action du récepteur NMDA semble être la zone pré-optique où sont situés les corps cellulaires des neurones à GnRH, tandis que pour les récepteurs AMPA et KA, le site d'action semble être plutôt localisé au niveau de l'ARH et de l'éminence médiane, où on retrouve les terminaisons des neurones à GnRH [37,74].

Le glutamate est également impliqué dans le contrôle des rétroactions des hormones stéroïdiennes sur les neurones à GnRH. Il a notamment été mis en évidence que les souris femelles dont le récepteur aux œstrogènes ER α était absent dans les neurones glutamatergiques, présentaient une puberté précoce liée à une altération du rétrocontrôle négatif, une stérilité et une absence de rétrocontrôle positif de l'œstradiol (ce dernier étant responsable du proœstrus et de la montée de GnRH / LH nécessaire à l'ovulation) [75].

L'action du glutamate semble s'exercer sur la GnRH principalement par le biais des récepteurs ionotropes NMDA, qui sont présents dans environ 50% des neurones adultes à GnRH chez les rongeurs [76–78]. Cependant, l'expression des récepteurs au glutamate change au cours de la vie dans les neurones à GnRH. Le récepteur métabotropique NMDAR n'est pas exprimé par les neurones à GnRH au cours du développement précoce, et la capacité du glutamate à moduler la sécrétion de GnRH est probablement due à une action indirecte passant par d'autres cellules exprimant le NMDAR [79]. Par ailleurs, il a été démontré que l'augmentation de la synthèse du glutamate se produisait en même temps que l'augmentation de la pulsativité de la GnRH à la puberté [80].

Ces récepteurs sont présents non seulement au niveau du soma des neurones à GnRH, mais aussi également dans un certain nombre de noyaux/régions hypothalamiques impliqués dans le contrôle de la sécrétion de la GnRH, comme l'AVPV, l'ARH et l'éminence médiane [81,82], indiquant que le glutamate peut affecter la sécrétion de GnRH de manière directe mais aussi de façon indirecte via les neurones à kisspeptine présent dans ces régions.

4.3. Le GABA

Bien qu'étant classiquement connu comme un neurotransmetteur inhibiteur, le GABA exerce un effet principalement excitateur sur les neurones de la GnRH via les récepteurs GABA de

type A [83,84]. Les récepteurs GABA de type A semblent être impliqués dans le rétrocontrôle inhibiteur de la progestérone sur les neurones à GnRH [85]. Dans une étude récente, il a démontré grâce à des techniques d'optogénétique et de chémogénétique que l'activation spécifique des fibres gabaergiques situées dans le noyau arqué entourant les neurones à GnRH était responsable d'une activation de l'axe HPG via une augmentation de la LH chez les souris mâles et femelles [86].

4.4. Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO) est également connu pour jouer un rôle important dans le contrôle de la reproduction. Cette molécule gazeuse est libérée par les neurones, les cellules endothéliales, les cellules hépatiques et les macrophages. Le NO est le produit de la conversion de la L-arginine en L-citrulline par une enzyme appelé l'oxyde nitrique synthase (NOS). Le NO, une fois sécrété diffuse librement à travers les membranes plasmiques pour effectuer son action.

Trois isoformes de cette enzyme ont été identifiées : deux éléments constitutifs : l'oxyde nitrique synthétase de type neural (nNOS), celle de type endothélial (eNOS), et un isoforme inductible NOS II (iNOS) [87].

Les nNOS sont exprimées dans la région pré-optique [88,89] à proximité du péricaryon des neurones à GnRH [90,91], tandis qu'au niveau de l'éminence médiane, l'immunoréactivité pour le nNOS est éloignée des terminaisons à GnRH, indiquant une modulation indirecte [90,92].

Le NO est un régulateur de la sécrétion de GnRH [93,94]. En effet, dans une étude réalisée par notre équipe, il a été démontré que le NO inhibait l'excitabilité des neurones à GnRH [91]. Par ailleurs, les taux de NO sont corrélés aux variations des taux d'œstrogènes au cours du cycle [95].

4.5. L'AMH

L'hormone antimüllérienne (AMH) est une glycoprotéine homodimérique appartenant à la superfamille des facteurs de croissance (TGF- β) [96]. L'AMH a été autrefois appelée substance Müllérienne inhibitrice (MIS) pour son rôle initialement décrit par le Professeur Jost dans la

régression des canaux de Müller chez les embryons mâles [97]. Chez la femme, l'AMH est sécrétée par les cellules de la granulosa des follicules ovariens [98] et régule le développement folliculaire précoce, intervenant dans la transition entre les follicules primordiaux et follicules en croissance [99,100].

a) Synthèse de l'AMH

Le gène de l'AMH a été séquencé et cloné chez les mammifères en 1986 [96,101]. Situé sur le chromosome 19 chez l'humain, sa séquence est extrêmement bien conservée au cours de l'évolution. Elle est en effet présente chez presque tous les mammifères [102–104], le poulet [105], les reptiles [106], les marsupiaux [107], le poisson zèbre [108] et les amphibiens [109]. Le gène est formé de cinq exons, l'homogénéité la plus importante étant observée entre les exons 2 à 5 entre toutes les espèces étudiées jusqu'à présent. Le gène de l'AMH code une pré-protéine de 560 acides aminés chez l'homme. Comme beaucoup de molécules de la superfamille du TGF β , l'AMH doit subir un clivage protéolytique pour acquérir sa fonction biologique. L'AMH est d'abord synthétisée sous la forme d'une protéine homo-dimérique de 140 kDa (composée de deux monomères de 70 kDa stabilisés par des ponts disulfures), et subit un clivage protéolytique pour devenir biologiquement active [110]. L'AMH_{N, C} (correspondant à l'association de la pro-région N-terminale à la région C-terminale de manière non covalente) représente la forme biologiquement active clivée, alors que l'AMH non clivée (proAMH) est bien décrite comme biologiquement inactive [111–113]. Le complexe non covalent (AMH_{N, C}) et la pro-hormone (proAMH) sont les deux formes circulantes chez la femme [114]. La partie N-terminale de la protéine, bien qu'elle n'ait aucune activité intrinsèque, a pour rôle d'amplifier l'activité de la région C terminale [115]. Seule la région C-terminale biologiquement active est nécessaire pour provoquer la régression des canaux de Müller [115]. Bien que le site de clivage pour former l'AMH bioactive ne soit actuellement pas connu, on suppose que la pro-protéine convertase de type subtilisine / kexine serait responsable du clivage de l'AMH [116]. Cependant, les enzymes capables de cliver l'AMH *in vivo* restent largement inconnues.

b) Voie de signalisation de l'AMH

En tant que membre de la famille des TGF β , l'AMH exerce son action via sa fixation à un complexe hétérodimérique de récepteurs transmembranaires ayant une activité sérine-thréonine kinase. Il a été démontré que l'AMH se liait exclusivement à un récepteur de type II, l'AMHR2

[117]. L'AMHR2 interagit ensuite avec trois récepteurs de type I de la famille des kinases de type Activine (ALK) - AcvR1 (récepteur de l'actine 1: ALK2), BMPR1a (récepteur de la protéine morphogénique osseuse 1A: ALK3) et BMPR1b (récepteur de la protéine morphogénique osseuse 1B: ALK6) [118,119]. Enfin, le complexe ainsi formé recrute canoniquement des protéines SMAD 1/5/8 qui sont transloquées dans le noyau et qui participent à la régulation de l'expression des gènes cibles [120,121] (Figure 5).

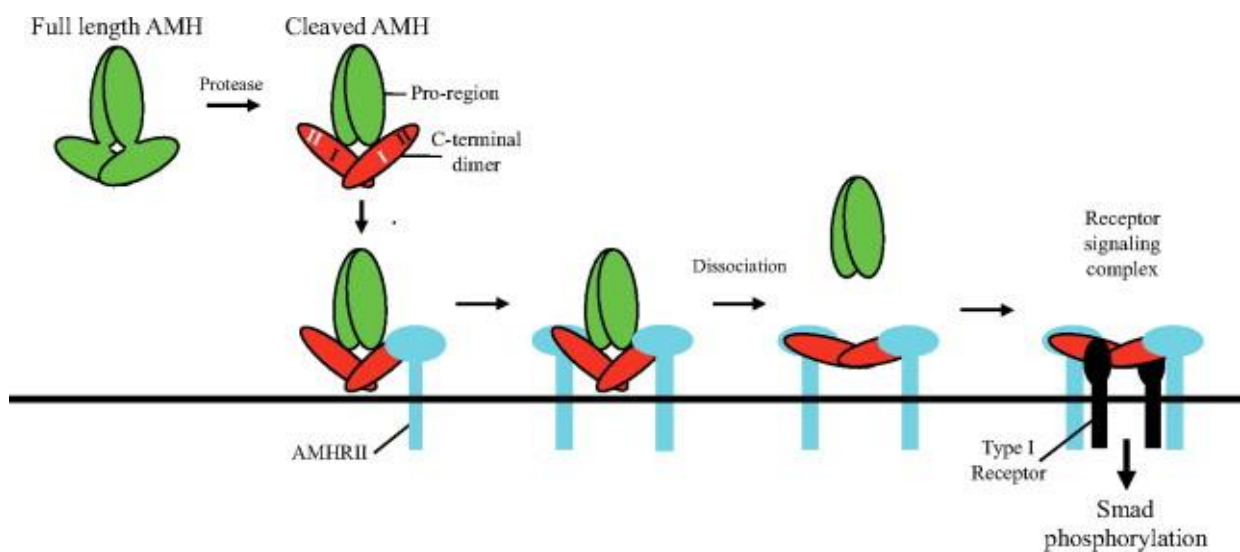


Figure 5 : Représentation schématique de la voie de signalisation de l'AMH. D'après Di-Clemente *et al*, 2010. [111]

c) Rôle de l'AMH dans l'ovaire

L'AMH est produite par les cellules de la granulosa de l'ovaire et, chez la femme, il existe une forte corrélation entre les taux sériques d'AMH et le nombre de petits follicules antraux mesurant 2 à 9 mm détectés par échographie [98,100,122]. Ainsi les taux circulants d'AMH sont reconnus pour être bien corrélés à la réserve ovarienne [98,100,122]. Le taux d'AMH est considéré comme prédictif de la réponse à la stimulation ovarienne contrôlée [123].

L'AMH est un régulateur de la folliculogénèse. Elle inhibe le recrutement folliculaire initial et donc l'entrée en croissance des follicules primordiaux chez la souris [99,100]. Dans les études chez les rongeurs et chez l'humain, il a été observé que l'AMH était sécrétée par des petits follicules antraux en croissance et freinait le recrutement et le développement folliculaire ultérieur. En outre, la maturation folliculaire FSH-dépendante *in vitro* est bloquée par l'ajout

d'AMH, ce qui indique que l'AMH est importante pour atténuer la sensibilité folliculaire à l'action cyclique de la FSH [124,125] (figure 6). Ceci est corroboré par une étude récente indiquant que les niveaux d'AMH fluctuent parallèlement au nombre de follicules antraux au cours du cycle menstruel [124].

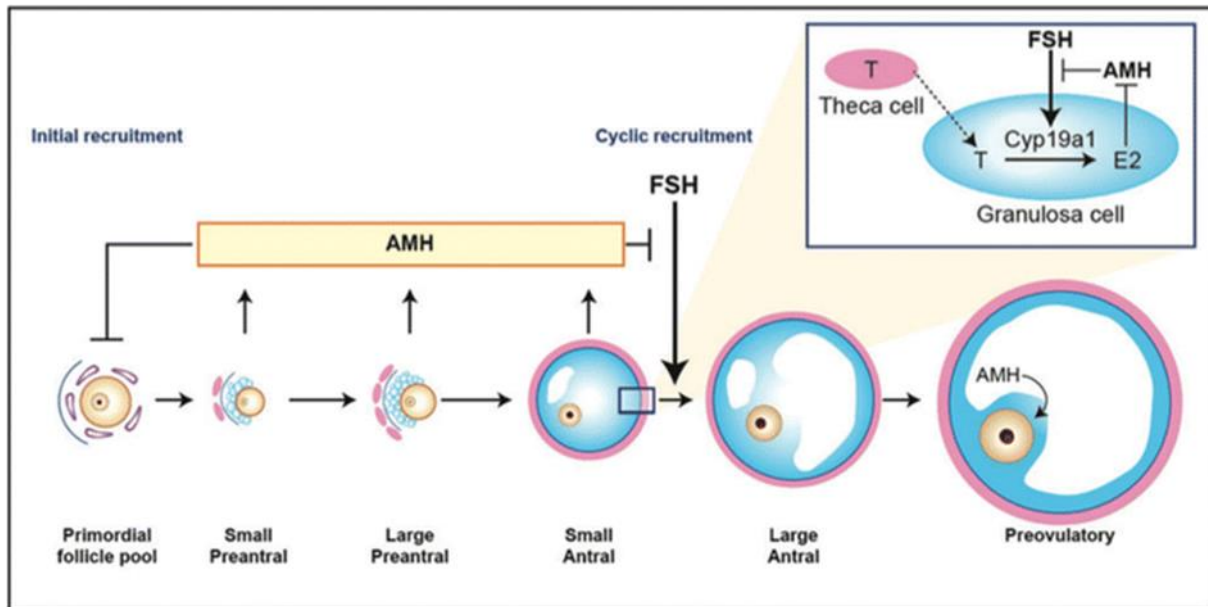


Figure 6 : Représentation schématique du mode d'action de l'AMH dans l'ovaire. Adapté d'après van Houten *et al.* (2010) [126]. L'AMH, produite par les cellules de la granulosa des petits follicules en croissance, inhibe le recrutement folliculaire initial, et la croissance FSH-dépendante des follicules antraux. L'AMH bloque la sélection du follicule dominant. En outre, l'AMH inhibe l'expression du CYP19a1 induite par la FSH, entraînant une réduction des taux d'œstradiol (E2), or l'E2 exerce un effet inhibiteur sur l'expression de l'AMH. T, testostérone ; Cyp19a1, aromatasase.

d) Modulation de la sécrétion de la GnRH par l'AMH

L'AMH est une glycoprotéine présente dans le sang circulant, ce qui suggère une fonction hormonale. Les principales sources de production identifiées jusqu'à présent sont les cellules de Sertoli des testicules et les cellules de granulosa des ovaires. Cependant, l'AMH et son récepteur exclusif, l'AMHR2, ont également été détectés dans la prostate, les poumons [127–130] et plusieurs autres organes, y compris le cerveau [131–134] et l'hypophyse [135], ce qui suggère que les effets biologiques de l'AMH pourraient être beaucoup plus étendus. Par ailleurs, il convient également de noter que les convertases responsables du clivage sont

exprimées par les neurones [136]. Dans une étude publiée en 2016, notre équipe a mis en évidence que l'AMH avait des effets extra-gonadiques et était notamment capable d'augmenter l'activité des neurones à GnRH. Il a dans un premier temps été observé que près de 50% des neurones à GnRH (murins et humains adultes) étaient dotés de récepteurs spécifiques AMHR2 [134]. La combinaison de plusieurs expériences *in vitro* et *in vivo* a démontré que l'AMH augmentait la sécrétion pulsatile de la LH dépendante de la GnRH, grâce à une action centrale. Au final, la hausse de la concentration d'AMH provoquerait une véritable réaction en chaîne : les neurones hypothalamiques sécréteraient davantage de GnRH, ce qui accroîtrait alors la production et la pulsatilité de LH par l'antéhypophyse (Figure 7).

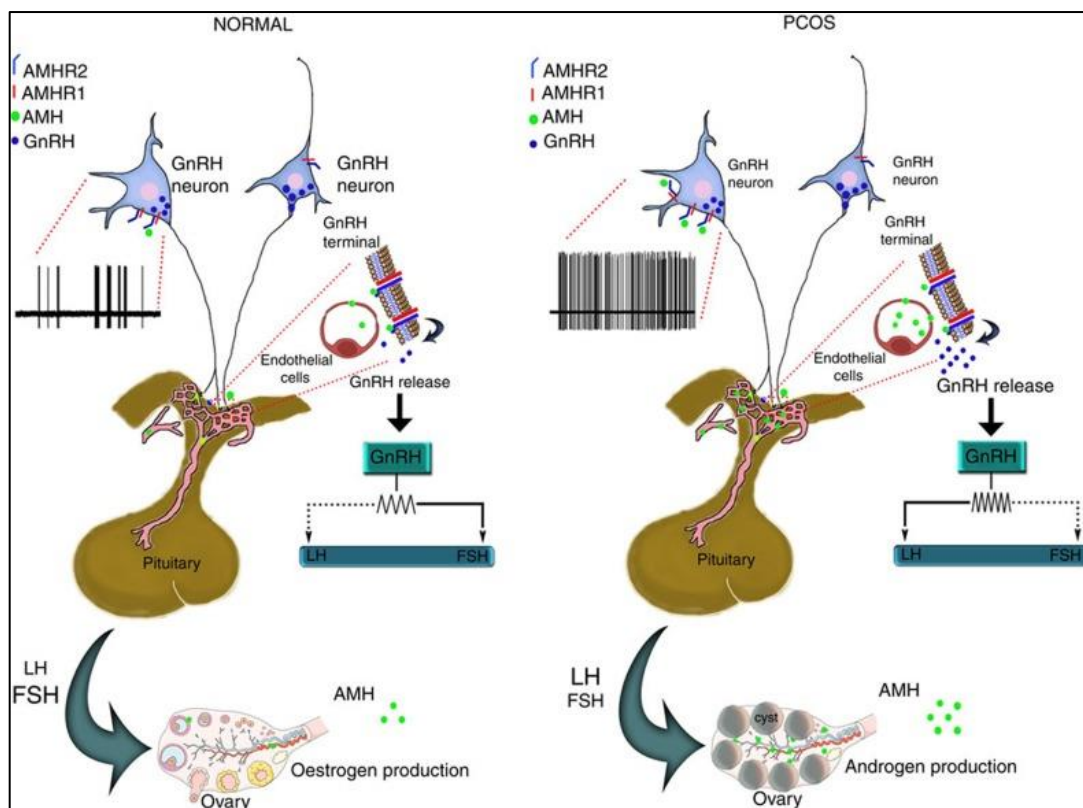


Figure 7 : Représentation schématique du mécanisme d'action proposé de l'AMH sur les neurones à GnRH des femmes à ovaire normal et des femmes avec un syndrome des ovaires polykystiques (SOPK). D'après Cimino *et al.*[134]. Chez les femmes atteintes de SOPK, dont les taux d'AMH sont 2 à 3 fois plus élevés, l'AMH pourrait court-circuiter la barrière hémato-encéphalique en passant par les capillaires fenêtrés pour agir directement sur les neurones à GnRH qui expriment l'AMHR2 pour augmenter la pulsatilité de la GnRH et de la LH. En effet, une hypertonie de la LH et une inversion du ratio FSH/LH sont fréquemment retrouvés dans cette pathologie. E2, œstrogènes ; T, Testostérone.

5. Plasticité de l'hypothalamus

De nombreuses études ont démontré que les cellules gliales jouaient un rôle essentiel dans la régulation de l'activité fonctionnelle du système nerveux, ainsi que l'existence d'une communication réciproque entre cellules gliales et neurones. En effet, il a été montré que les cellules gliales étaient sensibles à l'activité des neurones voisins et pouvaient moduler la transmission synaptique et la fonction neuronale [137–141]. Par ailleurs, les cellules gliales expriment des récepteurs pour les neurotransmetteurs et libèrent plusieurs substances qui agissent comme des gliotransmetteurs pouvant affecter la communication glie à glie et glie à neurone ainsi que la différenciation et la plasticité neuronale. Enfin, des modifications de la morphologie des cellules gliales sont capables de modifier la formation et le maintien de contacts synaptiques [142–144].

Les cellules gliales sont considérées comme d'importants médiateurs de la différenciation sexuelle de la connectivité neuronale induite par les hormones gonadiques. Ceci est corroboré par les conclusions de plusieurs études indiquant que la morphologie, l'immunoréactivité, l'activité enzymatique et l'expression génique de l'astroglie sont sexuellement dimorphiques dans le cerveau et peuvent être modifiées par les hormones sexuelles. De plus, les cellules gliales expriment des récepteurs pour les hormones gonadiques, métabolisent les stéroïdes gonadiques et participent également à la synthèse de stéroïdes endogènes par le système nerveux (pour revue, voir Garcia-Segura et Melcangi [145]).

La différenciation sexuellement dimorphique de l'astroglie peut avoir une incidence sur l'organisation du réseau neuronal qui régit l'activité et la sécrétion des neurones à GnRH. Ainsi, l'exposition du cerveau fœtal de cobayes [146], de rats [147], de souris [148], de porcins [149], de moutons [150–152], et de singes rhésus [153] à la testostérone entraîne des modifications du nombre et de la fonction des entrées synaptiques des neurones à GnRH. Des différences dans la morphologie des prolongements des cellules gliales associées aux neurones à GnRH ont été observées parallèlement à des changements synaptiques [148,152,154]. Le réseau de neurones à GnRH chez des femelles qui ont été exposés *in utero* à la testostérone présente une réponse altérée, semblable à celle observée chez le mâle [155,156].

Au cours de la période péri-pubertaire, les systèmes neuronaux qui régissent l'activité des neurones à GnRH, notamment les neurones GABAergiques, les neurones préproenkephalinerigiques, les neurones glutamatergiques et les neurones à kisspeptine, présentent des modifications morphologiques et fonctionnelles [157–160]. Parallèlement à ces changements, des modifications interviennent dans la morphologie de cellules épendymogliales situées au niveau de l'éminence médiane, et cette plasticité affecte la régulation de la libération de GnRH dans les capillaires fenêtrés de l'éminence médiane. Ces cellules épendymogliales spécialisées sont appelées tanocytes et tapissent le plancher du 3^{ème} ventricule, au niveau de l'éminence médiane.

Les tanocytes sont des cellules épendymogliales allongées qui ont été déjà décrites pour la première fois en 1909 par Ramon et Cajal [161] comme des cellules ressemblant aux cellules gliales radiales embryonnaires présentes uniquement dans des zones spécifiques du cerveau des oiseaux et des mammifères (Figure 8).

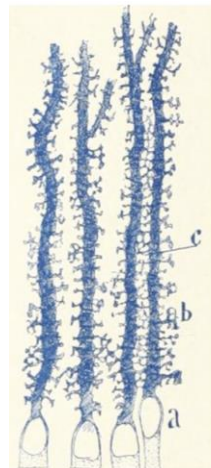


Figure 8 : Représentation schématique des tanocytes. D'après Ramon et Cajal [161] *Les tanocytes ressemblent à des cellules gliales radiales embryonnaires qui persistent dans des zones spécifiques du cerveau adulte, telles que l'éminence médiane de l'hypothalamus chez les mammifères. (A) À l'aide d'approches histologiques basiques comme la méthode d'Ehrlich, Cajal a visualisé des cellules épithéliales bordant les ventricules cérébraux qui envoient des prolongements vers la surface piale du cerveau chez la grenouille adulte. a. corps cellulaire ; b, prolongements ; c, varicosités collatérales [162]*

C'est seulement en 1954, que le terme tanyocyte (du grec « tanus » pour « étiré »), a été utilisé pour la 1^{ère} fois utilisé pour décrire ce groupe de cellules reliant le liquide céphalorachidien (LCR) et la surface piaie du cerveau chez des poissons cartilagineux. Parallèlement, Giuseppe Nazzareno Sterzi a attiré l'attention sur le caractère inhabituel du plancher de la cavité infundibulaire située directement au-dessus de l'hypophyse chez les poissons cartilagineux. Ce neuroanatomiste a en effet décrit deux types de structures épendymales : celles ressemblant à des tanyocytes présentant des prolongements et celles ayant peu pas de prolongements basaux rappelant les cellules épendymales cubiques classiques (Figure 9).

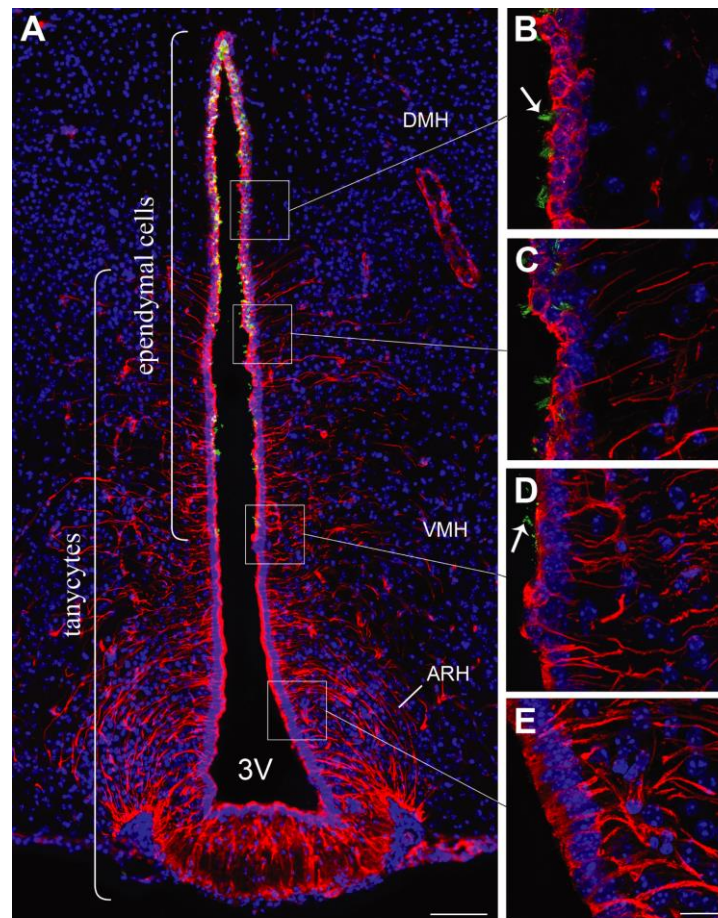


Figure 9 : Localisation des tanyocytes et des épendymocytes avec des cils battants dans la région tubérale de l'hypothalamus. D'après Prévot et al [162] (A) Photomontage à faible grossissement d'un immunomarquage pour la glu-tubuline (vert) et la vimentine (rouge). (B – D). Les tanyocytes présentent une immunoréactivité par la vimentine (en rouge) et les épendymocytes une immunoréactivité pour la glu-tubuline (vert). L'immunoréactivité pour la glu-tubuline est lié à la présence de cils au niveau des épendymocytes, non présents au niveau

des tanocytes. Images à fort grossissement montrant des cils immunoréactifs (verts, flèches) sur la surface ventriculaire au niveau du noyau dorsomédial (B, C) de l'hypothalamus (DMH) et du noyau ventromédian de la (D) hypothalamus (VMH). L'immunoréactivité pour la glutubuline est absente des tanocytes du (E) noyau arqué (ARH) et (A) de l'éminence médiane (ME) marqués par la vimentine. Les sections sont contre-colorées au Hoechst (bleu) pour visualiser les noyaux cellulaires et identifier les limites morphologiques de chaque structure hypothalamique. Barres d'échelle : (A) 100 μm ; (B – E) 20 μm . (F)

L'injection périphériques de colorants vitaux et d'encre de chine, a permis de mettre en évidence que l'éminence médiane de l'hypothalamus faisait partie intégrante de l'infundibulum et était irriguée par un plexus capillaire porte la reliant à l'antéhypophyse. C'est seulement avec l'avènement de la microscopie électronique dans les années 60-70 qu'il a été confirmé que les tanocytes reliaient effectivement le LCR à l'espace périvasculaire faisant face au système vasculaire porte hypothalamo-hypophysaire, caractérisé par la présence de capillaires fenêtrés [163–166]. Finalement l'observation de l'interaction morphologique entre les terminaisons neuroendocriniennes avec les pieds tanocytaires en contact avec l'espace péri-capillaire, laisse supposer que tanocytes joue un rôle clé dans le contrôle de la régulation de la sécrétion de neurohormones et dans la communication neuro-hémale (pour revue voir [162]). Les tanocytes contribuent à la régulation de la libération de GnRH par l'extension et la rétraction de leurs pieds qui s'interposent entre les terminaisons synaptiques des neurones à GnRH et le système porte [167–172] (Figure 10 et 11).

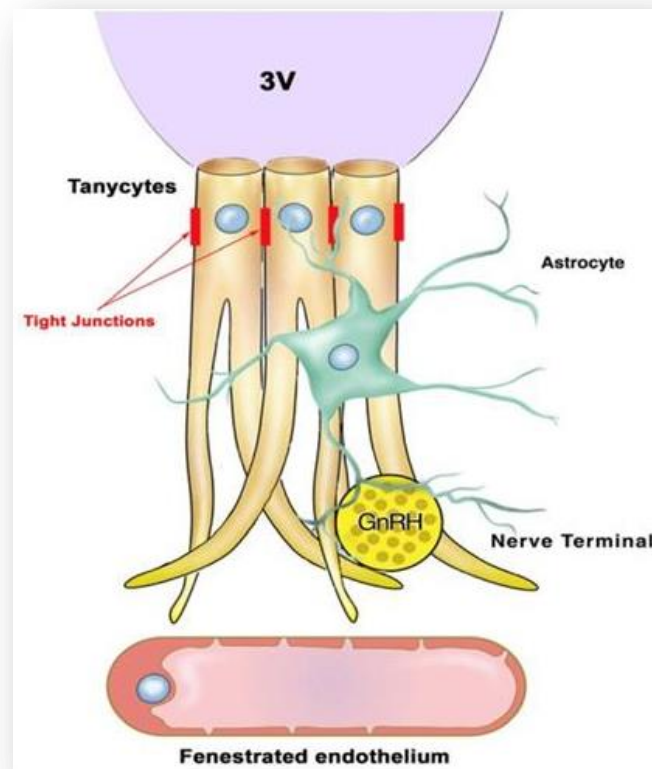


Figure 10 : Représentation schématique des types cellulaires (tanocytes, astrocytes et cellules endothéliales) et des terminaisons neuronales présents au niveau de l'éminence médiane de l'hypothalamus. D'après Prévot *et al.* [173]

5.1. Rôle des cellules gliales dans le contrôle de la libération de GnRH

Chez le rat, des modifications morphologiques des astrocytes directement au contact des neurones à GnRH situés dans la zone pré-optique rostrale sont associées à une modification de la libération des gonadotrophines. Au cours de l'après-midi du pro-œstrus, il y existe une diminution significative de la surface et du nombre de prolongements astrocytaires parallèlement à l'augmentation de la concentration plasmatique de LH. Le lendemain, au cours de l'œstrus, la surface et le nombre de prolongements par astrocyte reviennent à des niveaux similaires à ceux observés le matin du proœstrus avant la montée de LH [174].

Une situation similaire se produit dans l'éminence médiane au niveau des tanocytes: l'après-midi du proœstrus, les pieds tanycytaires se rétractent, autorisant ainsi le contact entre les

terminaisons à GnRH et les capillaires fenêtrés et favorisant donc la libération de la GnRH [171,172,175]. En diœstrus, quand la sécrétion de gonadotrophines est faible, les terminaisons axonales sécrétrices de GnRH (en vert) sont éloignées de l'espace péri-capillaire et les tancytes (jaune) enveloppent ces terminaisons à GnRH, entravant ainsi l'accès de la neurohormone à la circulation porte hypophysaire.

Ainsi, dans l'éminence médiane, comme dans la région pré-optique rostrale, les prolongements gliaux se rétractent au cours de la même phase du cycle œstral, suivis rapidement par l'extension des prolongements gliaux dans le noyau arqué. Ainsi, les hormones gonadiques facilitent la plasticité gliale et synaptique dans différentes régions du cerveau au cours du cycle œstral et ce, de manière spécifique et appropriée à la région.

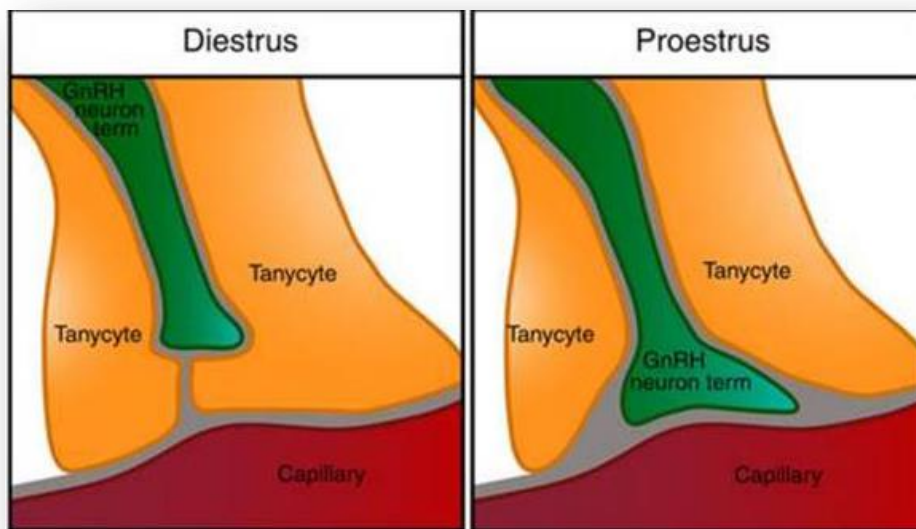


Figure 11 : Représentation schématique soulignant les changements morphologiques des pieds tancytaires au cours des différentes phases du cycle œstral chez le rongeur. D'après Parkash *et al.* [175]

L'une des questions en suspens est de savoir si les changements gliaux liés à la plasticité synaptique induite par l'œstradiol sont le résultat d'effets hormonaux directs sur les cellules gliales ou s'ils sont à médiation neuronale. Les astrocytes sont influencés par leur environnement neuronal, soit par contact direct, soit par des facteurs solubles libérés par les neurones. Ainsi, l'effet de l'œstradiol sur l'astroglie du noyau arqué peut dépendre, au moins en partie, de neurones porteurs de récepteurs aux hormones stéroïdiennes abondants dans cette

région. Cependant, l'hormone pourrait agir directement sur les cellules gliales. En effet, les cellules gliales expriment les récepteurs aux œstrogènes (ER) (voir revue de [176], y compris des astrocytes situés dans l'hypothalamus [177–179]. Des analyses immunohistochimiques ont également révélé l'existence d'astrocytes immunoréactifs pour le récepteur ER α dans l'hypothalamus humain [178,179].

De plus, Gudino-Cabrera et Nieto-Sampedro (1999) ont détecté une immunoréactivité pour ER α dans des tanocytes de rat [180]. Cette découverte soulève la possibilité que les œstrogènes aient des effets directs sur les astrocytes et tanocytes. D'autre part, il a été prouvé que des facteurs solubles, tels que les facteurs de croissance et les neurotransmetteurs, et les molécules d'adhésion pouvaient être à l'origine d'une communication neurone-glie dans l'hypothalamus et dans l'éminence médiane [180].

5.2. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les interactions neurone – glie associées à la régulation de la GnRH

Des facteurs solubles libérés par la glie hypothalamique tels que le TGF α ont été identifiés comme pouvant affecter les neurones et les cellules gliales afin de réguler la libération de la GnRH et potentiellement affecter le remodelage glial et neuronal dans le noyau arqué. Le TGF α est produit par les astrocytes hypothalamiques et agit de manière paracrine ou autocrine sur les mêmes types cellulaires afin de favoriser la production d'autres facteurs solubles, comme la prostaglandine E2 (PGE2), qui stimule la sécrétion de GnRH lors de sa liaison à des récepteurs spécifiques sur les neurones à GnRH [181]. Des études pionnières ont identifié la PGE2 comme un puissant régulateur de la fonction reproductive [182–184]. En effet, l'injection centrale de PGE2 directement dans l'aire pré-optique de rats, où sont localisés les corps cellulaires des neurones à GnRH, est responsable d'une augmentation des concentrations plasmatiques de LH [185].

De la même façon, pendant la période englobant la poussée pré-ovulatoire de gonadotrophines, l'expression du TGF α est accrue dans les astrocytes hypothalamiques, suivie d'une augmentation de l'expression des PGE2 et du TGF β [186]. Le TGF α libéré par les astrocytes est capable d'agir sur les tanocytes situés dans le noyau arqué et l'éminence médiane. La production de TGF α est régulée par les stéroïdes sexuels. En effet, *in vitro*, l'œstradiol

augmente l'expression du TGF α dans les astrocytes hypothalamiques [187]. Les tanocytes issus de cultures primaires répondent au TGF α via l'activation des récepteurs erb-1 en libérant de la prostaglandine E2 et du TGF β 1 [188]. Les tanocytes cultivés *in vitro* répondent au TGF α et au TGF β 1 avec des modifications morphologiques opposées : le TGF β 1 induit la rétraction des pieds tanocytaires, alors qu'une exposition courte au TGF α augmente la croissance des pieds tanocytaires et favorise la migration des tanocytes, qui présentent des changements remarquables de leur mobilité, prolongeant et rétractant leurs filopodes et les rendant ainsi capables de migrer vers l'extérieur à partir de leur site initial d'ensemencement. Cependant, une exposition prolongée au TGF α , pendant plus de 12 heures, entraîne la rétraction de leurs pieds, via un effet du TGF β 1 [188]. Par conséquent, le TGF α peut réguler l'extension et la rétraction des pieds tanocytaires par des actions directes et par des actions indirectes via le TGF β 1, respectivement, imitant les modifications morphologiques plastiques qui se produisent dans ces cellules pendant le cycle œstral. Les tanocytes peuvent également participer à la libération de GnRH dans le sang porte hypophysaire en fournissant d'autres signaux solubles, notamment le glutamate [189].

5.3. Rôle des sémaphorines dans la modulation de la plasticité de l'hypothalamus

Dans la zone externe de l'éminence médiane où sont localisées les terminaisons des neurones à GnRH, l'accès à l'espace péri-capillaire est régulé de deux manières distinctes faisant intervenir des sémaphorines. Les sémaphorines sont des protéines dont le rôle est de guider la croissance axonale. Deux sémaphorines ont un rôle particulier dans la plasticité de l'éminence médiane : la sémaphorine 7A (SEMA7A) et la sémaphorine 3A (SEMA3A). La SEMA7A agit comme guide lors de la migration des neurones à GnRH au cours de l'embryogenèse [190,191]. La SEMA3A a un rôle clé dans le développement du système à GnRH pendant la vie fœtale [16].

En phase de diœstrus, des taux élevés de progestérone associés à des taux circulants faibles d'œstrogènes favorisent la sécrétion de la SEMA7A par les tanocytes de l'éminence médiane. La SEMA7A se fixe à ses récepteurs représentés par l'intégrine β 1 et la plexine C1.

L'activation de l'intégrine $\beta 1$ favorise la croissance de pieds tanycytaires, qui vont englober les terminaisons des neurones à GnRH, en formant ainsi une barrière de diffusion empêchant la libération de GnRH dans les capillaires fenêtrés de l'éminence médiane. En parallèle, la SEMA7A agit sur le récepteur PlexinC1, qui est exprimé par les terminaisons à GnRH, pour provoquer la rétraction des terminaisons à GnRH de l'espace péri-capillaire.

Au contraire, en proœstrus, les taux élevés d'estrogènes circulant favorisent la libération de NO et de la SEMA3A par les capillaires fenêtrés de l'éminence médiane. La libération de NO favorise la rétraction des pieds tanycytaires [192,193]. La SEMA3A agit sur la neuropiline 1 (NRP1) exprimée par les terminaisons à GnRH pour favoriser leur germination vers les capillaires fenêtrés. Cette avancée est finalement guidée par un échafaudage de tanycytes facilitant ainsi la libération de la GnRH dans l'espace porte (Figure 12). Des mutations de la SEMA3A et de la SEMA7A ont par ailleurs été retrouvées chez des patients présentant un hypogonadisme hypogonadotrope congénital suggérant que la voie de signalisation impliquant les sémaphorines pourrait être nécessaire à l'extension et à la rétraction normale des pieds tanycytaires nécessaire à la fonction reproductive chez l'homme [194]. Chez la femme, des modifications structurales dans l'hypothalamus ont également été observées de manière indirecte grâce à une approche par imagerie. Ces modifications sont dépendantes des stéroïdes gonadiques [195].

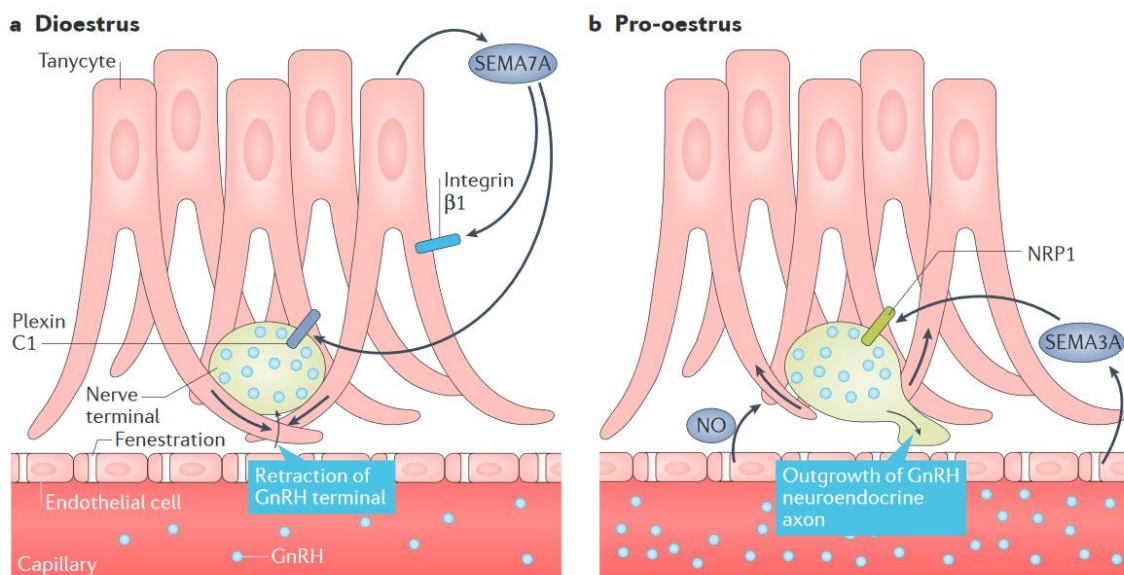


Figure 12 : Coordination entre les cellules gliales, neuronales et endothéliales régulant la sécrétion de GnRH au cours du cycle œstral. D'après Clasadonte et Prevot [196]

Enfin, ces découvertes pourraient avoir des implications cliniques importantes et thérapeutiques potentielles dans l'infertilité d'origine hypothalamique. La perturbation des cycles œstraux, avec notamment un allongement de la durée des cycles associée à des niveaux circulants élevés de LH chez la souris chez laquelle la $\beta 1$ -intégrine est sélectivement supprimée dans tanocytes semble récapituler, au moins en partie, le phénotype neuroendocrinien reproductif observé dans une pathologie reproductive endocrinienne fréquente appelée le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) et ceci dans deux modèles animaux de SOPK [148,175,197,198].

CHAPITRE 2 : LE SYNDROME DES OVAIRES POLYKYSTIQUES

Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) est une pathologie reproductive endocrinienne complexe, très fréquente affectant plus de 10% des femmes dans le monde [199–201]. L'infertilité est une caractéristique fréquente du SOPK. Près de 75% de ces femmes souffrent d'infertilité en raison d'une anovulation, faisant ainsi du SOPK la cause la plus fréquente d'infertilité anovulatoire [202].

1. Critères diagnostiques

Le SOPK a été pour la première fois décrit en 1935 par Stein et Leventhal comme un syndrome associant à des degrés variables une dysovulation, un hirsutisme, la présence d'ovaires élargis et une obésité. Ce syndrome est en fait caractérisé par sa présentation hétérogène, dépendant de la présence ou de l'absence de traits cardinaux, comprenant l'hyperandrogénie (HA), l'oligo-anovulation et un aspect d'ovaires polykystiques à l'échographie (ou PCOM pour polycystic ovarian morphology).

En fonction de la présence de ces critères cardinaux, le diagnostic du SOPK a été proposé par trois classifications différentes qui sont rentrés en conflit pendant de nombreuses années [203,204]. En 1990, une première classification a été proposée par le National Institute of Health (NIH) reposant sur la présence de deux critères : l'HA clinique et / ou biochimique et l'oligo-anovulation (OA), en l'absence d'autres explications. Cette première définition n'incluait pas le critère PCOM mais à l'époque les critères échographiques étaient jugés peu fiables. C'est à partir de 2003, qu'une deuxième définition fut proposée par l'European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) et l'American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Cette classification ajoutait l'aspect morphologique d'ovaires polykystiques à l'échographie (PCOM) comme caractéristique clé avec comme seuil retenu, la présence d'au moins 12 follicules mesurant 2 à 9 mm de diamètre dans chaque ovaire, et/ou un volume ovarien augmenté (plus de 10cm³). En utilisant les critères ESHRE / ASRM, le consensus de Rotterdam établit que deux des trois critères cardinaux étaient finalement requis afin de poser le diagnostic de SOPK.

En 2006, les critères de la société Androgen Excess-PCOS ont proposé de diagnostiquer le SOPK en présence des deux critères suivants : HA (clinique ou biochimique) et

dysfonctionnement ovarien (comprenant la dysovulation et / ou le PCOM) [205]. Cette définition était corroborée par le fait que l’hyperandrogénie était considérée comme le critère prédominant dans le SOPK. Par conséquent, les femmes ne présentant pas d’hyperandrogénie ne pouvaient donc pas être considérées comme ayant un SOPK. Enfin en 2012, le NIH a entériné la classification élargie ESHRE / ASRM, faisant des critères de diagnostic de Rotterdam de 2003 les plus utilisés et consensuels au niveau international (Tableau 1). Cette définition aboutit à l’existence de 4 phénotypes en fonction de la présence de ces critères (Figure 1).

Tableau 1 : Classifications utilisées pour le diagnostic de SOPK

	1990 NIH	2003 ESHRE/ASRM (Critères de Rotterdam)	2006 AE-PCOS society	2012 NIH consensus
Critères	2 critères sur 2 nécessaires	2 critères sur 3 nécessaires	2 critères sur 2 nécessaires	Recommande l’utilisation des critères de Rotterdam de 2003 avec distinction de 4 phénotypes
	1. HA 2. OA	1. HA 2. OA 3. PCOM	1. HA 2. Dysfonction ovarienne (OA, PCOM ou les 2*)	

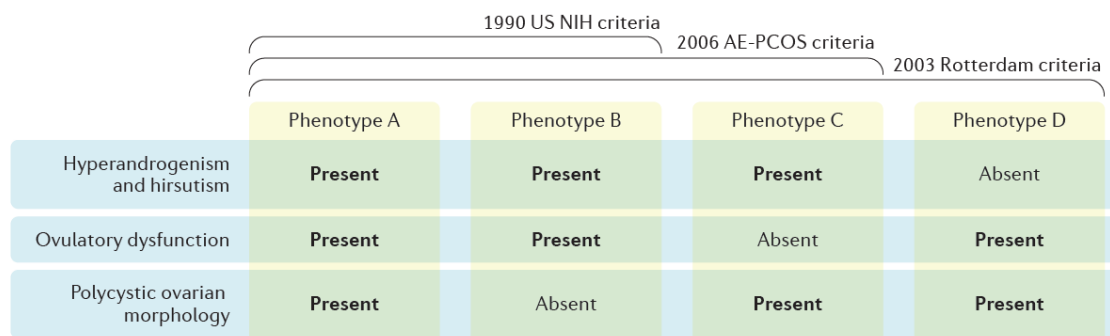


Figure 1 : Critères diagnostiques et phénotypes dans le SOPK. D'après Azziz *et al*, 2016. *Le SOPK peut être classé en 4 phénotypes distincts (A-D) selon la présence ou l'absence des 3 traits cardinaux : hyperandrogénie (clinique ou biologique), dysfonction ovulatoire, et aspect d'ovaires polykystiques. Seul le phénotype A inclut les 3 caractéristiques. NIH : National Institutes of Health, AE : Androgen Excess-PCOS society*

L'exclusion des troubles apparentés ou mimétiques (tels que la dysovulation due à une hyperprolactinémie ou à un dysfonctionnement thyroïdien, le syndrome de Cushing, l'hyperplasie surrénalienne, est nécessaire quels que soient la classification utilisée. Bien que son principe fondamental (deux des trois critères requis) soit toujours valable, chacune de ses trois caractéristiques principales: l'oligo-anovulation, l'HA clinique ou biochimique et le PCOM doivent être mise à jour [204]. En particulier, la définition du PCOM proposée en 2003 (soit 12 follicules ou plus par ovaire entier mesurant de 2 à 9 mm de diamètre) est obsolète avec l'essor des appareils d'échographie de dernière génération. En 2014, un groupe de travail de la société Androgen Excess et du SOPK a recommandé d'utiliser un seuil supérieur à 25 follicules par ovaire pour la définition de PCOM [206]. De plus, les taux sériques d'AMH semblent constituer un excellent substitut au compte folliculaire antral [207]. En effet, l'AMH est produite par les cellules de la granulosa des petits follicules en croissance, reflétant le nombre de follicules par ovaire chez les femmes atteintes du SOPK [98,208,209]

Le SOPK étant un syndrome par définition et non une pathologie en raison de sa variabilité phénotypique, son diagnostic reste difficile. Il n'existe pas de symptôme constant sur lequel serait basé le diagnostic, et d'autre part des symptômes souvent associés sont retrouvés mais sans rapport direct avec le SOPK. En effet, le SOPK s'associe souvent à un dysfonctionnement métabolique et à un risque accru de résistance à l'insuline, de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires [199,200].

2. Présentation clinique du SOPK

2.1. L'hyperandrogénie clinique.

Sa définition repose sur les 3 principaux symptômes : l'hirsutisme, l'acné et l'alopecie. L'hirsutisme est défini comme une pilosité de type masculine chez la femme avec la présence de poils terminaux. Les poils terminaux font référence à des poils de plus de 5 mm de longueur, qui possèdent une médullaire (axe compact de kératinocytes) et sont habituellement pigmentés. Le diagnostic de l'hirsutisme est basé sur l'utilisation du score de Ferriman et Gallwey modifié [210]. Ce score (figure 2) consiste en une gradation visuelle de la pilosité sur une échelle allant de 0 (pas de poils terminaux visibles) à 4 (présence de poils terminaux s'apparentant à une pilosité masculine) de 9 zones corporelles reconnues sensibles aux androgènes (lèvre supérieure, poitrine, cou, abdomen, avant-bras, cuisses, bas du dos, bas de l'abdomen). La somme des scores de chaque zone est additionnée afin d'obtenir le score final. Un score $\geq 4-6$ est considéré comme anormal [211], mais ce seuil, dépend également de l'origine ethnique. En effet, alors qu'un seuil bas semble approprié pour des populations asiatiques, un seuil plus élevé est cohérent pour des femmes méditerranéennes hispaniques [212].

Par ailleurs, un certain nombre de mises en garde concernant l'évaluation du score modifié de Ferriman-Gallwey doivent être considérées avec en particulier le fait que la croissance terminale des poils en rapport avec une hyperandrogénie se développera de manière progressive et risque souvent de ne pas être complètement exprimée chez les adolescentes atteintes de SOPK.

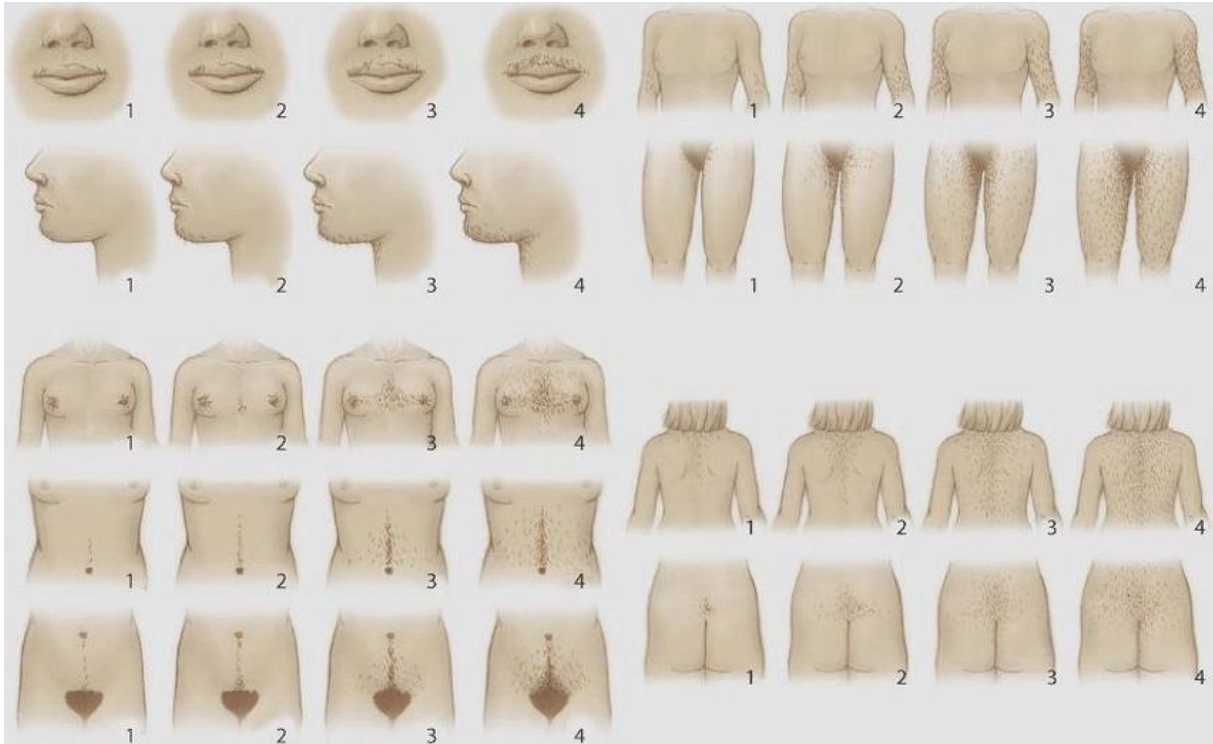


Figure 2 : Score de Ferriman Gallway modifié

L'acné et l'alopecie sont d'autres signes cliniques d'hyperandrogénie. Toutefois, en l'absence d'hirsutisme, l'acné est un signe peu fiable d'hyperandrogénie. Une classification plus précise de l'acné (type de lésions, topographie, etc.) augmenterait probablement sa spécificité, mais elle n'existe pas à ce jour. L'acné affecterait 15 à 25% des femmes atteintes de SOPK mais il n'a pas encore été démontré qu'il existait une augmentation de la prévalence de l'acné dans le SOPK par rapport à la population générale [205].

Enfin, l'alopecie doit être de type androgénétique pour pouvoir se distinguer des autres causes de perte de cheveux. L'alopecie androgénétique se caractérise par une perte de cheveux graduelle, localisée au niveau du vertex et des tempes et par un affinement du cheveu. Ce type d'alopecie est lié à une sensibilité accrue aux androgènes. Au contraire, la majorité des femmes atteintes d'alopecie féminine (diffuse et sagittale) ne présente pas d'hyperandrogénie [213].

2.2. L'hyperandrogénie biologique.

La définition de l'HA biologique est une problématique qui n'a pas encore été résolue. La plupart des auteurs s'accordent sur le fait que les tests actuellement disponibles pour le dosage des androgènes plasmatiques ont une faible sensibilité. Il est actuellement recommandé d'utiliser des dosages de haute performance tels que les dosages immunologiques par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse pour l'évaluation la plus précise possible de la testostérone totale ou libre dans le SOPK. L'évaluation de la testostérone libre et de l'indice d'androgènes libre (FAI) ou de la testostérone biodisponible sont également recommandés [211]. En effet, la majorité de la testostérone circulante est liée à des protéines de transport, telle que la SHBG (sex hormone-binding globulin) ou la CBG (corticosteroid-binding globulin), mais aussi à l'albumine. La testostérone biodisponible correspond à la fraction libre (non liée à la SHBG) de la testostérone et à la fraction liée à l'albumine (celle-ci étant facilement mobilisable car rapidement dissociable).

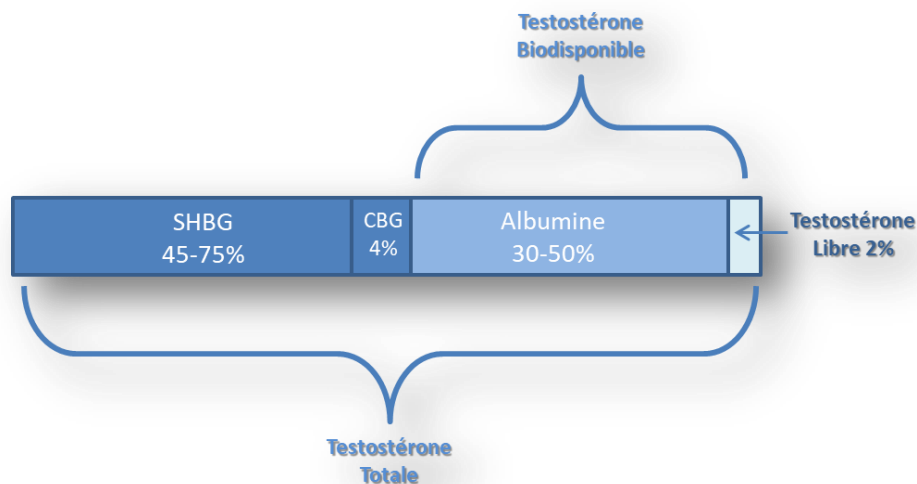


Figure 3 : Représentation schématique de la biodisponibilité de la testostérone. Adapté d'après Tostain et al [214]

Le FAI, correspondant au rapport entre la testostérone totale et la SHBG semble être le paramètre biologique le plus sensible de l'HA biologique [215]. Cependant, la production de SHBG au niveau hépatique est extrêmement sensible aux effets négatifs de l'insuline. Par conséquent, le FAI est artificiellement augmenté dans des conditions d'hyperinsulinisme, créant ainsi un biais majeur dans la définition de l'HA, en particulier chez les femmes obèses. Pour

certaines, l'évaluation des androgènes a pour objectif principal d'exclure d'autres pathologies responsables d'HA, en particulier des tumeurs sécrétant des androgènes ou de l'hyperthécose (hyperplasie bénigne du stroma de la thèque). Cette évaluation doit être basée sur une stratégie progressive afin d'éviter des dépenses inutiles. Il semble inutile de démontrer une HA biologique en l'absence de symptômes cliniques chez les femmes atteintes de PCOM, en particulier si elles ont une OA. Un dosage d'androstènedione et de dehydroépiandrostérone sulfate (DHEAS) doivent être envisagés si le taux de testostérone total ou de testostérone libre est normal [211].

2.3. Oligo-anovulation

L'oligo-ovulation est généralement suspectée lorsqu'il existe une oligo-spanioménorrhée. L'oligospanioménorrhée correspond à un allongement de la durée des cycles menstruels associé à des règles peu abondantes et traduit une anomalie endocrine. On parle de cycles menstruels irréguliers lorsque 3 ans après la ménarche les cycles sont inférieurs à 21 jours ou supérieurs à 35 jours, ou s'il existe moins de 8 cycles /an [211].

Cependant, toutes les femmes oligo-anovulantes ne présentent pas une oligo-aménorrhée cliniquement évidente. Chez certaines femmes, le dysfonctionnement ovulatoire se présente sous la forme de saignements menstruels fréquents (polyménorrhée), alors que d'autres patientes affectées peuvent présenter des cycles mensuels d'apparence réguliers (c.-à-d., une euménorrhée).

En fait, il a été montré qu'entre 15 et 40% des femmes souffrant d'une hyperandrogénie et déclarant avoir des cycles réguliers sont en réalité oligo-anovulante [216].

La définition de l'oligo-anovulation n'inclut pas la dysovulation infraclinique, que l'on retrouve avec une certaine prévalence dans la population générale, associée ou non à une HA. Certains auteurs proposent de considérer les cas modérés de SOPK comme des femmes ayant des cycles réguliers, certaines étant réellement anovulantes, même en l'absence d'hyperandrogénie. En effet, plus la fréquence d'anovulation est élevée, plus les concentrations sériques de testostérone et d'AMH seront élevées [217]. Il est donc recommandé, en particulier en cas d'infertilité, de vérifier chez les femmes le taux sérique de progestérone sur deux cycles consécutifs, entre le

20^{ème} et le 24^{ème} jour du cycle chez les femmes ayant des cycles réguliers et un aspect échographique d'ovaires polymicrokystiques.

2.4. Pathologies associées et complications dans le SOPK

a) Troubles métaboliques et obésité

Le SOPK est associé à une résistance à l'insuline qui s'aggrave avec l'âge [218,219] Une obésité est retrouvée chez 30 à 60% des femmes diagnostiquées SOPK [220], sans qu'il s'agisse pour autant d'un symptôme pouvant être à l'origine de la maladie. Il n'existe en effet pas d'augmentation de la prévalence du SOPK avec l'obésité [220]. Aucune association n'a non plus été trouvée entre des gènes impliqués dans l'obésité et des gènes impliqués dans le SOPK [221–223].

En raison de l'augmentation du risque de diabète, les femmes SOPK sont plus à risque de développer un syndrome métabolique et des pathologies vasculaires. Le SOPK semble être associé à une augmentation du risque cardiovasculaire. Une augmentation de l'hypertension artérielle, des accidents vasculaires cérébraux et des thromboses veineuses profondes a été retrouvée dans le SOPK [224–226].

b) Impact psychologique

Les femmes atteintes de SOPK sont plus à risque de développer des troubles du stress, de l'anxiété et une dépression. Ce risque semble d'autant plus important chez les patientes ayant une hyperandrogénie ou une insulino-résistance [226,227]. Néanmoins, ni l'hyperandrogénie, ni l'insulino-résistance ne permettent d'expliquer complètement la prévalence des désordres psychiatriques dans le SOPK [227]. En effet, une augmentation de l'incidence de la dépression et de l'anxiété a été retrouvée indépendamment du phénotype rencontré et de l'existence d'une obésité [228,229].

c) Infertilité et complications obstétricales

En raison de l'oligo-anovulation, la prévalence de l'infertilité est 15 fois plus élevée chez les femmes souffrant d'un SOPK indépendamment de l'IMC [230]. Environ 2 femmes sur 3 diagnostiquées SOPK sont infertiles [230]. En cas de grossesse, les femmes souffrant d'un SOPK ont un risque plus élevé des complications obstétricales (prééclampsie, accouchement

prématuré, macrosomie, diabète gestationnel) sans que ce risque puisse être bien expliqué [226,231,232].

d) Cancer de l'endomètre

En raison de la combinaison d'une oligo-anovulation (favorisant l'hyperoestrogénie) et d'un hyperinsulinisme, les patientes atteintes d'un SOPK présentent un risque de cancer de l'endomètre 2 à 6 fois élevé que la population générale [211,226].

3. Prise en charge du SOPK

Le traitement du SOPK doit être adapté à chaque patient et est souvent multifactoriel. Les interventions axées sur le mode de vie constituent un traitement de première intention. Le traitement de l'infertilité chez les femmes atteintes du SOPK peut comprendre des modifications du mode de vie (alimentation, exercice et stratégies comportementales), des traitements médicamenteux par voie orale (tels que le citrate de clomifène, le létrozole ou la metformine) ou par injection (gonadotrophines), un traitement chirurgical (chirurgie ovarienne laparoscopique).

3.1. Modification du mode de vie.

La modification des habitudes de vie est le traitement de 1^{ère} ligne du dysfonctionnement métabolique dans le SOPK. Il permet également d'améliorer la fertilité [233]. Le suivi de règles hygiéno-diététiques adaptées améliorent l'ovulation chez 40 à 50% des femmes atteintes du SOPK, dont 30 à 40% pourront obtenir une grossesse de manière spontanée [234]. La perte de poids chez les femmes atteintes de SOPK en surpoids ou obèses améliore leur profil métabolique et permet de restaurer des cycles ovulatoires [235].

3.2. Traitements médicamenteux

Le traitement de 1^{ère} intention pour restaurer l'ovulation chez les femmes SOPK anovulantes est le létrozole qui est un inhibiteur d'aromatase [211] cependant celui-ci n'a pas reçu l'AMM

en France dans cette indication. Le citrate de clomifène seul ou en association avec de la metformine peut également être utilisé comme traitement de 1^{ere} intention dans l'infertilité, et permet d'augmenter les chances de grossesse.

L'utilisation d'injections de gonadotrophines représente la seconde ligne thérapeutique après échecs des traitements inducteurs de l'ovulation par voie orale sus cités. Une intervention chirurgicale de type laparoscopie en vue d'un drilling ovarien peut également être envisagé en 2^{ème} ligne thérapeutique [211,236].

Finalement, le recours à l'assistance médicale à la procréation et à la fécondation in vitro (FIV) est considéré comme le traitement de 3^{ème} intention en cas d'échecs des lignes thérapeutiques précédentes. En effet, il n'existe pas d'études randomisées cliniques ayant montré la supériorité de la FIV dans la prise en charge de l'infertilité dans le cas du SOPK [211]. De plus, la FIV chez les patientes SOPK s'accompagne d'un risque plus élevé d'hyperstimulation.

La prise en charge des femmes SOPK ne se réduit pas à la prise en charge de l'infertilité et d'autres options thérapeutiques peuvent être retenues en fonction des symptômes présents (dysfonctionnement métabolique, l'hyperandrogénie, fragilité psychologique et émotionnelle).

On peut ainsi retenir en l'absence de désir de grossesse, l'utilisation d'une contraception oestro-progestative afin de traiter l'hyperandrogénie. Celle-ci peut être utilisée en association avec de la metformine pour les femmes en surpoids ou présentant un désordre métabolique [211]. En cas de contre-indication ou d'intolérance aux oestro-progestatifs, des anti-androgènes peuvent être proposés en 2^{nde} intention [211].

3.3. Chirurgie bariatrique.

La chirurgie bariatrique est une option à prendre en considération pour les femmes qui échouent à perdre du poids uniquement grâce au régime alimentaire [237]. Une méta-analyse incluant 13 études a montré que la chirurgie bariatrique diminuait l'incidence des symptômes du SOPK de 45,6% à 7,1%, en rapport avec une perte de poids moyenne de 57,2% [238].

4. Origine du SOPK

Bien que le SOPK soit une maladie endocrinienne fréquente, son origine reste non élucidée. En effet, de nombreuses études ont fait état de causes génétiques et/ou environnementales.

4.1. Causes génétiques

En raison de son fort caractère héréditaire, le SOPK a été longtemps considéré comme une maladie à substrat génétique. En effet, 30 à 50% des apparentés au premier degré de femmes atteintes présentant un SOPK [202,239–241]. Des études chez des jumeaux monozygotes estiment l'héritabilité du SOPK à 65% [242]. L'analyse génétique utilisant une approche gène candidat a généré plus de 100 gènes potentiellement impliqués dans le SOPK [216]. Des études d'association pangénomiques plus récentes (GWAS), ont identifié des loci de susceptibilité accrue au SOPK. Ces loci contiennent des mutations dans des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse, la voie de signalisation de l'insuline et les récepteurs des gonadotrophines chez des patients atteintes de SOPK de descendance chinoise et européenne [243–252]. Le cas du gène *DENDD1A* est intéressant (the domain differentially expressed in normal and neoplastic domain containing 1A gen). La fonction du gène *DENDD1A* est indéterminée, mais celui-ci est exprimé dans les cellules thécales responsables de la synthèse des androgènes [251] Il est donc susceptible de moduler la production d'androgènes et donc la libération de GnRH.

Chez des femmes chinoises de la province de Han souffrant du SOPK, un variant pour le domaine DENN / MADD contenant 1A (*DENND1A*) a été retrouvé comme étant associé à un dysfonctionnement métabolique [250]. Ce même variant est associé à un risque d'hyperandrogénie [249] et d'ovaires polykystiques [253] chez des patients d'ascendance européenne. Les phénotypes associés aux variants découverts peuvent également fournir un aperçu de la pathophysiologie conférée par les gènes de susceptibilité. En effet, dans les populations d'origine européenne, *DENND1A* était un allèle à risque d'hyperandrogénie et de dysovulation, alors que les polymorphismes *DENDD1A* n'étaient pas fortement associés au SOPK dans une population coréenne [254], suggérant des différences ethniques. D'autres loci de susceptibilité ont été identifiés comme celui du récepteur à la FSH (FSHR), ou du récepteur à l'hormone chorionique gonadotrope /lutéinisante (LHCGR) [249,250].

Cependant, ces variants ne peuvent ainsi pas expliquer tous les cas de SOPK. Une analyse fonctionnelle supplémentaire est nécessaire pour prouver la corrélation avec la majorité des locus identifiés. A l'heure actuelle, les variants génétiques identifiés par des GWAS n'expliquent qu'à peine 10% des cas de SOPK, laissant supposer d'autres causes dont peut-être un impact de l'environnement fœtal dans le développement du SOPK.

4.2. Causes épigénétiques

Outre les altérations génétiques, des modifications épigénétiques peuvent être à l'origine de modifications de l'expression des gènes sans atteinte de la séquence primaire de l'ADN. Ces changements incluent la méthylation de l'ADN et la modification des histones, qui, une fois acquises, peuvent persister tout au long de la vie de l'organisme sans stimulation continue [255]. La plupart des auteurs s'accordent maintenant sur le fait qu'il existe une différence entre les profils globaux de méthylation de l'ADN chez les patientes souffrant de SOPK par rapport aux témoins (pour revue voir Vazquez-martinez 2019 [256])., Il a par exemple été observé une diminution de la méthylation du promoteur du gène LHCGR dans les cellules de la granulosa de femmes SOPK par rapport à des femmes non atteintes. Cette diminution de la méthylation est associée avec une augmentation de l'expression du gène. Or les variants de LHCGR sont connus pour être associés à une plus grande sensibilité des follicules à la LH et pourraient ainsi contribuer à l'HA observée dans la SOPK. Des augmentations de la méthylation du promoteur de l'aromatase ovarienne ont également été observées, pouvant elles aussi contribuer à l'HA. Une étude récente réalisée auprès de femmes chinoises Han a identifié un épissage anormal des récepteurs aux androgènes exclusivement dans les cellules de la granulosa dans 62% des patientes atteintes de SOPK [257]. Les variants d'épissage anormaux étaient significativement corrélés à une hyperandrogénie, à des taux d'AMH élevés dans le liquide folliculaire et à une folliculogenèse anormale [257].

Des modifications épigénétiques peuvent être initiées par des facteurs environnementaux présents pendant la vie fœtale et qui vont programmer la maladie chez l'adulte [258]. Le facteur environnemental le plus souvent utilisé expérimentalement est l'exposition à de fortes concentrations d'androgènes, pouvant conduire à des modifications épigénétiques qui persistent plus tard à l'âge adulte. L'analyse de la méthylation de sites spécifiques du génome entier chez des singes rhésus infantiles et adultes à la suite d'une exposition aux androgènes injectés chez la

mère en milieu de gestation a révélé de nombreux loci méthylés de manière différentielle [259]. Une association directe de ces profils de méthylation de gènes candidats avec des patientes atteintes de SOPK n'a pas encore été identifiée. Cependant, l'exposition aux androgènes en période prénatale est fortement liée à l'organisation des tissus fœtaux, y compris les organes reproducteurs périphériques et les circuits hypothalamiques cérébraux.

4.3. Le SOPK, une pathologie neuroendocrinienne

Le SOPK était considéré depuis longtemps principalement comme une pathologie gonadique, mais plus récemment, de plus en plus de preuves ont commencé à faire la lumière sur les déficiences neuroendocrines associées à la physiopathologie de ce syndrome [46]. Chez les femmes atteintes du SOPK, les taux sériques d'AMH sont fréquemment 2 à 3 fois plus élevés que chez les femmes non atteintes [207,260]. De plus, la sévérité du phénotype du SOPK est corrélée à la production d'AMH, qui est plus élevée chez les patientes SOPK anovulantes que chez les patientes SOPK ovulantes [261–263]. Il est intéressant de noter que les taux d'AMH circulant sont significativement plus élevés chez les singes rhésus naturellement hyperandrogènes, qui présentent des caractéristiques typiques retrouvées chez les femmes atteintes du SOPK [264].

Les observations cliniques rapportant le lien entre des taux d'AMH élevés et le SOPK ont permis de découvrir le rôle physiologique crucial de l'AMH dans la folliculogénèse [265]. Dans ce syndrome, un nombre accru de follicules pré-antraux sécrètent des taux anormalement élevés d'AMH. L'AMH est responsable d'une anovulation en inhibant l'action de la FSH sur la croissance folliculaire entre le stade antral et le stade pré-ovulatoire. L'excès d'AMH observé dans le SOPK est donc responsable d'un excès de follicules en croissance et d'un défaut de sélection du follicule dominant lié à la baisse de l'aromatase et donc à la diminution de l'œstradiol.

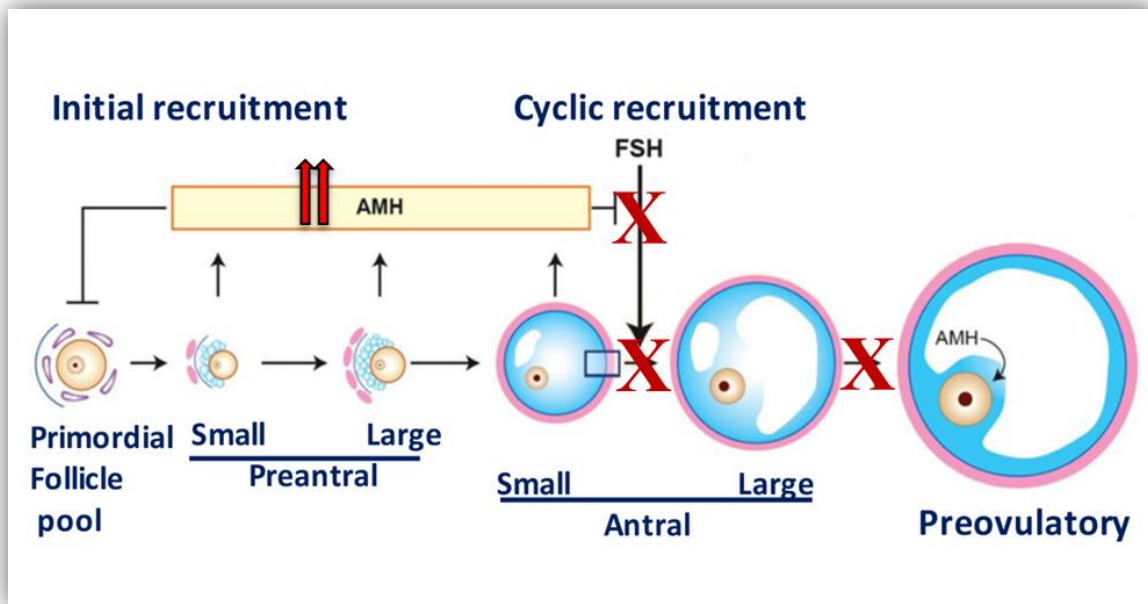


Figure 4 : Représentation schématique des conséquences d'un taux élevé d'AMH dans le SOPK. Adapté d'après van Houten et al. [126]. *Des concentrations élevées en AMH vont être responsable d'une inhibition du recrutement cyclique FSH-dépendant et donc empêcher l'ovulation.*

Chez les femmes atteintes du SOPK, une corrélation positive entre les taux sériques de LH et d'AMH a été démontrée [266] indépendamment des taux d'androgènes et de FSH [267]. En outre, plusieurs auteurs ont montré que la LH pouvait stimuler la sécrétion et l'expression de l'AMH [261,268]. L'hypertonie de la LH concerne environ 50% des femmes souffrant de SOPK, avec une prévalence allant jusqu'à 95% pour les femmes atteintes du SOPK ne présentant pas de dysfonction métabolique [269]. Les taux sériques élevés de LH chez les femmes SOPK sont connus pour aggraver l'hyperandrogénie en stimulant la production d'androgènes dans les cellules thécales. Une des hypothèses pour expliquer l'hyperpulsatilité de la LH chez ces femmes atteintes SOPK est qu'il existerait une atteinte du rétrocontrôle négatif de la progestérone consécutif à une androgénisation hypothalamique prénatale; [46,270]. La pulsatilité élevée de la LH suggère également une accélération de la pulsatilité de la GnRH [271,272].

Dans le SOPK, il existe des preuves substantielles qu'un dysfonctionnement neuroendocrinien hypothalamique du profil de sécrétion de la GnRH, et donc de la libération de LH et de FSH pourrait être impliquées. Comme la GnRH est difficilement dosable dans le sang périphérique

en raison de sa demi-vie courte, les observations sur la libération de GnRH dans le SOPK sont déduites à partir des concentrations de LH / FSH et de la fréquence de la pulsativité. Plusieurs études ont mis en évidence qu'il existait chez les femmes SOPK une augmentation du taux de LH, du rapport LH / FSH et de la pulsativité [273,274]. Au niveau ovarien, l'inversion du ratio LH/FSH en faveur de la LH empêche une maturation folliculaire appropriée (en lien avec une baisse relative de la FSH) et l'augmentation de la LH contribue à une surproduction d'androgènes par les cellules thécales [275]. En résumé, ces observations indiquent que la libération accrue de GnRH, tant en fréquence qu'en quantité, constitue un aspect physiopathologique important dans de nombreux cas de SOPK. Cependant, il n'est pas clair si cette anomalie de sécrétion est à l'origine ou au contraire secondaire à d'autres dysfonctionnements retrouvés dans le SOPK.

Des études cliniques ont commencé à disséquer cette fonction neuroendocrine anormale dans le SOPK. Il a été mis en évidence que les taux physiologiques de progestérone circulante, efficaces pour réduire la fréquence de la pulsativité de la GnRH / LH chez la femme en bonne santé, ne permettaient pas de réduire l'hyperpulsativité de la LH chez la femme SOPK, indiquant ainsi un échec des mécanismes habituels de rétrocontrôles négatifs par les hormones stéroïdiennes [276]. Des travaux ont en effet montré que la réduction de la fréquence et de l'amplitude de la sécrétion de la LH en réponse à l'administration exogène d'estradiol et de progestérone était significativement moins importante chez les femmes atteintes de SOPK par rapport à des témoins [276–278].

Dans une étude ultérieure, il a été montré que l'administration chronique d'un antagoniste des récepteurs aux androgènes, le flutamide, n'avait aucun effet sur la fréquence ou l'amplitude des pulses de LH, ni sur les taux de LH, ni sur la réponse à la GnRH exogène chez les patientes SOPK, indiquant que l'hyperandrogénie n'était pas une cause directe des anomalies observées [279]. Le flutamide avait toutefois permis de rétablir un rétrocontrôle négatif afin de réduire la fréquence des pulses de LH lorsque de l'œstradiol et de la progestérone étaient administrés, suggérant que l'HA pourrait contribuer indirectement à un dysfonctionnement neuroendocrinien en interférant avec le rétrocontrôle négatif des stéroïdes ovariens. Au cours de la majorité du cycle menstruel, l'œstradiol et la progestérone exercent une activité inhibitrice sur les neurones à GnRH via un rétrocontrôle négatif. En fin de phase folliculaire, la hausse des taux d'estradiol provoque le passage à un rétrocontrôle positif, provoquant un pic de GnRH / LH qui déclenche l'ovulation. Ce mécanisme classique de rétrocontrôle homéostatique entre le

cerveau et les ovaires est altéré dans le SOPK [276,278], ce qui entraîne une hyperactivité de l'axe HPG, perturbant la régulation neuroendocrinienne de l'ovaire.

L'hyperpulsatilité de la LH reflète probablement une augmentation similaire de la fréquence des impulsions de GnRH et suggère une hyperactivité des neurones à GnRH. Bien qu'il soit actuellement difficile de doser la GnRH chez la femme, la canulation du système porte hypophysaire chez le mouton démontre que la sécrétion de LH est le reflet de la sécrétion pulsatile de la GnRH [280]. Cependant, le mécanisme sous-jacent à l'augmentation de la pulsatilité de la LH dans le SOPK n'est pas bien compris. De plus en plus d'études suggèrent que des taux d'androgènes élevés, agiraient de manière centrale pour entraîner une augmentation de la GnRH / LH qui provoquerait en aval un dysfonctionnement ovarien [279,281,282]. Comme précédemment expliqué, les androgènes ne semblent pas modifier directement la sécrétion de GnRH. Au lieu de cela, les androgènes pourraient interférer avec la capacité de l'estradiol et de la progestérone à exercer leur rétrocontrôle négatif pour supprimer la sécrétion de GnRH / LH, contribuant ainsi à une fréquence de pulsatilité élevée de la GnRH / LH.

Par ailleurs, les boucles de rétrocontrôles négatives par les hormones stéroïdiennes dans le SOPK surviennent avec l'apparition de la puberté [283,284] et ne sont pas associées à un défaut de synthèse de l'estradiol et de la progestérone par l'ovaire. En effet, les taux sériques d'estradiol et de progestérone chez les femmes SOPK sont similaires à ceux des femmes témoins [273,276]. Ces résultats suggèrent que le problème réside au niveau de l'action des hormones stéroïdes sur l'hypothalamus.

La réduction de la sensibilité aux hormones stéroïdiennes au niveau du réseau neuronal afférent au réseau à GnRH est un mécanisme pouvant ainsi expliquer la physiopathologie du SOPK. La cartographie de l'expression des récepteurs des hormones stéroïdiennes dans des modèles de rongeurs SOPK a permis d'apporter des éléments de réponse à cette théorie.

Ainsi, dans un modèle murin de SOPK (souris PNA) a montré que l'expression du récepteur à la progestérone (PR) est significativement réduite dans noyau AVPV, le PeN et, de manière plus spectaculaire, dans l'ARH [197]. Parallèlement à cette perte d'expression du PR, il a été démontré que l'administration de progestérone dans le même modèle animal après la castration était incapable de réduire de manière significative l'augmentation de la LH [285]. Cette diminution de l'expression du PR dans l'ARH a également été confirmée dans un modèle SOPK

(androgénisation prénatale) de brebis [286]. On retrouve dans ce même modèle animal un dysfonctionnement du rétrocontrôle des hormones stéroïdiennes [287].

De manière surprenante, il apparaît que l'expression des récepteurs aux œstrogènes spécifiques ER α est en grande partie inchangée dans le cerveau de modèles animaux de SOPK (androgénisation prénatale) de rongeurs [197,288].

Notre compréhension des mécanismes spécifiques sous-jacents aux altérations du rétrocontrôle spécifique aux œstrogènes et à leur contribution dans la physiopathologie du SOPK est actuellement médiocre. Cependant, il a été montré que l'inactivation du ER α dans les neurones à kisspeptine, produisait un phénotype de type SOPK chez la souris [289].

Ainsi d'autres populations neuronales essentielles aux rétrocontrôles inhibiteurs semblent être impliquées dans le SOPK

4.4. Autres populations neuronales impliquées dans le SOPK

Trois populations ont été particulièrement étudiées :

a) Les neurones à kisspeptine

Compte tenu du puissant effet excitateur de la kisspeptine sur la sécrétion de GnRH / LH [290] d'une part et que les neurones à kisspeptine expriment les récepteurs PR, ER α et AR d'autre part, il a été évoqué que la voie de signalisation de la kisspeptine pourrait être impliquée dans la physiopathologie du SOPK.

Dans un modèle SOPK de brebis (androgénisation prénatale), l'expression du PR dans l'ARH est réduite sans que le nombre de neurones immunoréactifs pour la kisspeptine dans cette région ne soit modifié [291]. De plus, dans ce même modèle animal les neurones à kisspeptine situés dans l'AVPV et l'ARH présentent un nombre réduit d'appositions au niveau de leur soma [292], ce qui suggère qu'une modification de la régulation des neurones de kisspeptine par des neurones présynaptiques pourrait également être impliquée, mais cela reste à expliquer.

Cependant, les travaux portant sur les neurones à kisspeptine montrent des résultats discordants. En effet, certaines études cliniques ont mis en évidence des concentrations

plasmatiques / sériques de kisspeptine plus élevées chez les femmes atteintes de SOPK [286,293,294], alors que d'autres ont constaté que les taux de kisspeptine n'étaient pas différents [295,296].

À ce jour, les preuves issues de modèles animaux de SOPK n'ont pas permis de clarifier l'implication du dysfonctionnement du système kisspeptine-GnRH / LH dans le SOPK. En effet, certains auteurs n'ont pas mis en évidence d'altérations dans la voie de signalisation de la kisspeptine et d'autres mettent en évidence des résultats discordants. Par exemple, le nombre de neurones à kisspeptine situés dans l'ARH est soit augmenté, diminué ou inchangé selon l'étude considérée.[297] Il est possible que ces discordances soient partiellement expliquées par les différences entre les espèces ou par le type de modèle SOPK utilisé. Cependant, des résultats contradictoires ont été retrouvés également au sein d'un même modèle de rat SOPK [288,298,299].

b) Les neurones à glutamate

Il existe peu de preuves d'une modification de la régulation glutamatergique responsable d'un profil de sécrétion de GnRH / LH similaire à celui observé dans le SOPK. Chez les femmes souffrant d'un SOPK, les niveaux de glutamate dans le liquide céphalorachidien ne diffèrent pas de ceux observés chez des femmes témoins [300]. De manière similaire, les appositions glutamatergiques sur les neurones à GnRH ne sont pas modifiées dans les modèles animaux de SOPK [197,301]. Enfin, les neurones glutamatergiques situés dans la zone péri-ventriculaire de l'hypothalamus chez la femelle singe ne semblent pas être sensibles à la progestérone, rendant ainsi peu probable l'hypothèse d'une contribution directe des neurones glutamatergiques dans la diminution du rétrocontrôle inhibiteur de la progestérone dans le SOPK [302].

c) Les Neurones GABAergiques

L'implication de la neurotransmission GABAergique dans la physiopathologie du SOPK a été mise en évidence par plusieurs études [148,197,198].

En effet, il est connu depuis plusieurs années que des traitements antiépileptiques (valproate) responsables d'une augmentation du tonus GABAergique dans le cerveau sont fortement associés à un risque accru de développer des symptômes similaires au SOPK, à savoir une

hyperandrogénie, une dysovulation et des ovaires polykystiques [303–305]. De plus, les femmes atteintes de SOPK présentent des concentrations plus élevées de GABA dans le liquide céphalorachidien que les femmes témoins [300].

Dans un modèle animal de souris SOPK (androgénisation prénatale), l'augmentation des courants post-synaptiques GABAergiques dans les neurones à GnRH [148,306] est susceptible de contribuer à l'hyperactivité de la GnRH / LH. Plus récemment, il a été identifié que l'innervation GABAergique dans les neurones à GnRH était augmentée chez ces souris SOPK [86,197]. Par ailleurs, la majorité de cette innervation accrue provient de neurones GABAergiques situés dans l'ARH [197]. Or, l'ARH est une région connue pour son importance dans le rétrocontrôle inhibiteur de la progestérone [38,39]. Parallèlement, il a été montré que l'augmentation de l'innervation GABAergique des neurones à GnRH était corrélée à une réduction de l'expression du PR dans cette population de l'ARH, impliquant ainsi les neurones GABAergiques dans le rétrocontrôle inhibiteur de la progestérone dans le SOPK [197].

Ces données confirment ensemble que la perte de sensibilité à la progestérone du circuit de neurones GABAergiques du noyau arqué se projetant sur les neurones à GnRH pourrait expliquer le dysfonctionnement du rétrocontrôle inhibiteur de la progestérone et contribuer à l'hyperactivité de la GnRH / LH dans le SOPK.

Cependant, la population de neurones GABAergiques de l'ARH coexprime une variété de neuropeptides / enzymes, comme le neuropeptide Y, la tyrosine hydroxylase et l'oxyde nitrique synthase neuronal [307]. Il est ainsi difficile de savoir si la perte de sensibilité à la progestérone et l'innervation accrue des neurones à GnRH se produisent dans une sous-population spécifique de neurones GABAergiques ou dans l'ensemble de la population de l'ARH.

4.5. Apport des modèles animaux dans la connaissance de la physiopathologie du SOPK

Malgré ces progrès dans la compréhension de l'étiologie et des mécanismes physiopathologiques à l'origine du SOPK, les études cliniques se heurtent à des limites inhérentes à l'examen des modifications neurobiologiques de ce trouble. La manipulation de facteurs environnementaux, en particulier l'administration prénatale d'androgènes, a permis la

génération de modèles animaux portant de nombreuses similitudes phénotypiques avec le SOPK chez des espèces allant des rongeurs aux ongulés et aux primates. De plus, le développement de souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente verte dans les neurones à GnRH a permis d'étudier la régulation stéroïdienne et métabolique de la fonction de reproduction directement au niveau neuronal. Avec ces modèles, plusieurs équipes ont commencé à disséquer l'interaction complexe de plusieurs systèmes aboutissant au dysfonctionnement neuroendocrinien observé dans le SOPK.

Bien qu'aucun modèle animal ne puisse parfaitement résumer une pathologie humaine, ces modèles sont inestimables pour permettre des manipulations impossibles à effectuer chez l'homme et pour isoler des variables physiologiques afin de mieux comprendre la physiopathologie du syndrome. Les modèles animaux les plus utilisés pour étudier le SOPK sont basés sur l'exposition prénatale aux androgènes. Des observations précoces chez des singes pseudohermaphrodites femelles, initialement étudiées pour déterminer leur comportement [308], ont montré que l'exposition à la testostérone *in utero* entraînait des symptômes analogues à ceux du SOPK, tels qu'une hyperandrogénie chez l'adulte [309], suggérant une étiologie développementale pour expliquer ce désordre. Ce modèle a ensuite été caractérisé chez le singe, puis reproduit chez plusieurs espèces pour donner des phénotypes analogues. Les femmes atteintes d'hyperplasie congénitale surrénalienne, qui produisent des androgènes en excès et malgré une normalisation des taux après la naissance, manifestent souvent des symptômes du SOPK à l'âge adulte, ce qui a conféré une pertinence étiologique particulière à ces modèles [310]. De la même façon, l'administration de testostérone à des transsexuelles stimule l'entrée en croissance des follicules primordiaux conférant aux ovaires un aspect polykystique à l'échographie [311]. Enfin, il a été montré que les femmes atteintes de SOPK présentaient des taux d'androgènes élevés pendant la grossesse [312,313], en association avec une diminution des activités aromatasase placentaire de la 3β -HSD-1 et de la P450, pouvant contribuer à l'augmentation des androgènes [313]. Une étude a également mis en évidence que la concentration en testostérone dans les veines ombilicales chez les fœtus filles de femmes atteintes du SOPK était élevée, et atteignait des taux similaires à ceux des fœtus de sexe masculin [314]. Ce résultat n'est cependant pas retrouvé de manière constante [315]. La somme de ces observations suggère toutefois un mécanisme possible d'exposition fœtale excessive aux androgènes chez les filles atteintes de SOPK. Cette exposition leur conférait un risque élevé de développer le syndrome à l'âge adulte.

Ainsi, le modèle animal le plus utilisé consiste en une hyperandrogénisation (HA) prénatale (modèle PNA pour prenatal androgenization). La PNA consiste le plus souvent en l'injection de dihydrotestostérone (DHT) de testostérone (T) ou de propionate de testostérone (TP) chez la mère en milieu de gestation. Cette HA prénatale est responsable de l'apparition des signes cardinaux reproductifs du SOPK et des comorbidités associées fréquemment à ce syndrome dans la descendance des animaux exposés. Ces symptômes apparaissent après la puberté.

Les phénotypes observés dans la descendance sont très variés et dépendent notamment de la durée d'exposition, du moment précis de l'exposition aux androgènes pendant la gestation, et de l'espèce animale étudiée. Le moment de l'exposition est un critère prépondérant car il existe une fenêtre de susceptibilité aux androgènes.

Par exemple, alors que le modèle PNA murin n'est pas associé à une augmentation du risque d'obésité et d'insulino-résistance pour la descendance, ce même modèle utilisé chez le primate (singe) est responsable de l'apparition de troubles métaboliques à l'âge adulte [153,316,317]. Le modèle PNA chez le rongeur est également différent selon l'espèce étudiée, le modèle PNA chez la souris est considéré comme un modèle de SOPK « mince » alors que ce modèle utilisé chez le rat est plutôt représentatif d'un modèle de SOPK « obèse » lié à l'apparition de troubles métaboliques. (cf tableau 2 ci-après d'après Moore *et al* ,[318]).

Tableau 2 : Synthèse des différents modèles animaux de SOPK

Espèces	Période d'exposition	Type de traitement	Altération cycle oestral	Anomalies ovariennes	HA	Troubles métaboliques	Réduction sensibilité insuline	LH	Altération rétrocontrôle négatif	Altération Rétrocontrôle positif
Singes rhésus	Prénatal précoce	TP	oui	PCOM, ovaires élargis, anovulation	oui	↑ poids, et graisse abdominale	non	taux élevés	E2 + P	non
	Prénatal tardif	TP	oui	ovaires élargis	oui	↑ graisse abdominale	oui	normaux	P	non
Mouton	Prénatal	TP	oui	PCOM, ovaires élargis, ↓ corps jaunes	oui	↑ poids	oui	taux élevés et ↑ pulsativité	E2 + P	oui
	Prénatal	DHT	.	ovaires élargis, ↑ nbre follicules en croissance	non	.	oui	taux élevés et ↑ pulsativité	E2	non
Rat	Prénatal	DHT	oui	PCOM, ↓ corps jaunes, ↓ follicules pré-ovulatoires, ↓ couche cellules de la granulosa	oui	↑ poids	.	taux élevés et ↑ pulsativité	.	oui
	Prénatal	T	oui	↓ corps jaunes et follicules pré-antraux/antraux	oui	↑ poids et masse grasse	.	taux élevés	.	oui
	Néonatal	TP	oui	PCOM, ↓ corps jaunes	non	↑ poids, masse grasse et taux de leptine	oui	.	.	.
	Pré-pubertaire	DHT	oui	PCOM, ↓ couche de cellules de la granulosa	non	↑ poids et masse grasse	oui	.	.	.
	Pré-pubertaire	Letrozole	oui	hyperplasie cellules de la thèque, absence de corps jaunes	oui	↑ poids et masse grasse	oui	taux élevés	.	.
	Post-pubertaire	Letrozole	oui	↓ corps jaunes, PCOM et ovaires élargis	oui	.	.	taux élevés	.	.
Souris	Prénatal	DHT	oui	↓ corps jaunes, follicules atrétiques, hyperplasie thécale	oui	↑ masse grasse	non	taux élevés et ↑ pulsativité	E2+P	non
	Pré-pubertaire	DHT	oui	↓ corps jaunes, atrésie folliculaire	↑ DHT	↑ poids et graisse inguinale	non	normaux	.	.
	Post-pubertaire	Letrozole	oui	PCOM, absence de corps jaunes, follicules antraux atrétiques	oui	↑ poids et masse grasse	.	taux élevés	.	.

D'autres modèles ont été utilisés notamment des modèles d'hyperandrogénisation post-natale par l'administration de testostérone ou de DHT mais également aussi grâce au létrozole (cf Tableau). Le létrozole est un inhibiteur de l'aromatase non stéroïdien, il empêche donc la conversion des androgènes en œstradiol et entraîne donc une hyperandrogénie. Des expériences menées chez le rat ont montré que l'administration de létrozole entraîne l'apparition de troubles du cycle, d'une augmentation de la FSH et de la testostérone chez le rat [319–322], mais

également chez la souris [323]. Contrairement au modèle PNA, les effets du létrozole administré en post natal (à partir de la 4^{ème} semaine de vie) sont réversibles à son arrêt.

L'importance des androgènes et de leur voie de signalisation dans la physiopathologie du SOPK a été également démontrée grâce à des manipulations génétiques ciblant le récepteur des androgènes. Les souris KO pour le récepteur aux androgènes exposées à une HA prénatale (via l'administration de DHT) ne développent pas les symptômes cardinaux du SOPK à l'âge adulte [301].

De plus, l'importance de la voie de signalisation des androgènes dans le cerveau dans la physiopathologie du SOPK a été mise en évidence par des KO spécifiques de l'AR dans des régions spécifiques. En effet, l'androgénisation prénatale n'entraîne pas l'apparition de la plupart de symptômes du SOPK chez les animaux ayant subi une invalidation de l'AR spécifiquement dans le cerveau. Au contraire, un KO spécifique au niveau des cellules de la granulosa ovarienne n'est pas suffisant pour prévenir l'apparition des symptômes à l'âge adulte consécutive à l'administration de DHT en période prénatale [282,324,325].






	+ DHT = androgen excess				
	Active AR	Global loss of AR	Neuronal loss of AR	Granulosa cell loss of AR	Theca cell loss of AR
					
	Development of clinical PCOS traits?				
Irregular cycles/acyclicity	✓	✗	✓	Partial	Partial
Oligo- or anovulation	✓	✗	✗	✓	✗
Multi-cystic ovarian appearance	✓	✗	Partial	✓	✗
↑ Unhealthy large antral follicles	✓	✗	✗	✓	?
↓ Granulosa Cell Layer Thickness	✓	✗	✓	✗	?
↑ Theca Cell Layer Thickness	✓	✗	✓	✓	?
↑ body weight	✓	✗	✗	✓	-
↑ body fat	✓	✗	✗	✓	-
Adipocyte Hypertrophy	✓	✗	Partial	✓	-
↓ Adiponectin	✓	✗	✓	✓	-
Dyslipidemia*	✓	✗	✗	✓	-
Hepatic Steatosis	✓	✗	Partial	✓	-
Impaired fasting glucose	✓	✗	✓	✓	-

Figure 5 : Sites d'action hypothétiques d'action des récepteurs aux androgènes (AR) impliqués dans le développement des caractéristiques du SOPK (d'après Walters best practice 2018). ✓Caractéristique présente ✗ caractéristique absente ? non évalué, - non évaluable car le modèle SOPK ne présentait pas de phénotype métabolique

Dans une étude récente, nous avons mis en évidence que l'AMH dont les taux sont plus élevés chez les femmes atteintes de SOPK, également pendant la grossesse [198,326], pouvait être à l'origine d'une reprogrammation prénatale. En effet, la progéniture des souris femelles traitées par des injections pendant la gestation développent un phénotype de type SOPK hyperandrogénique à l'âge adulte (Figure 6)

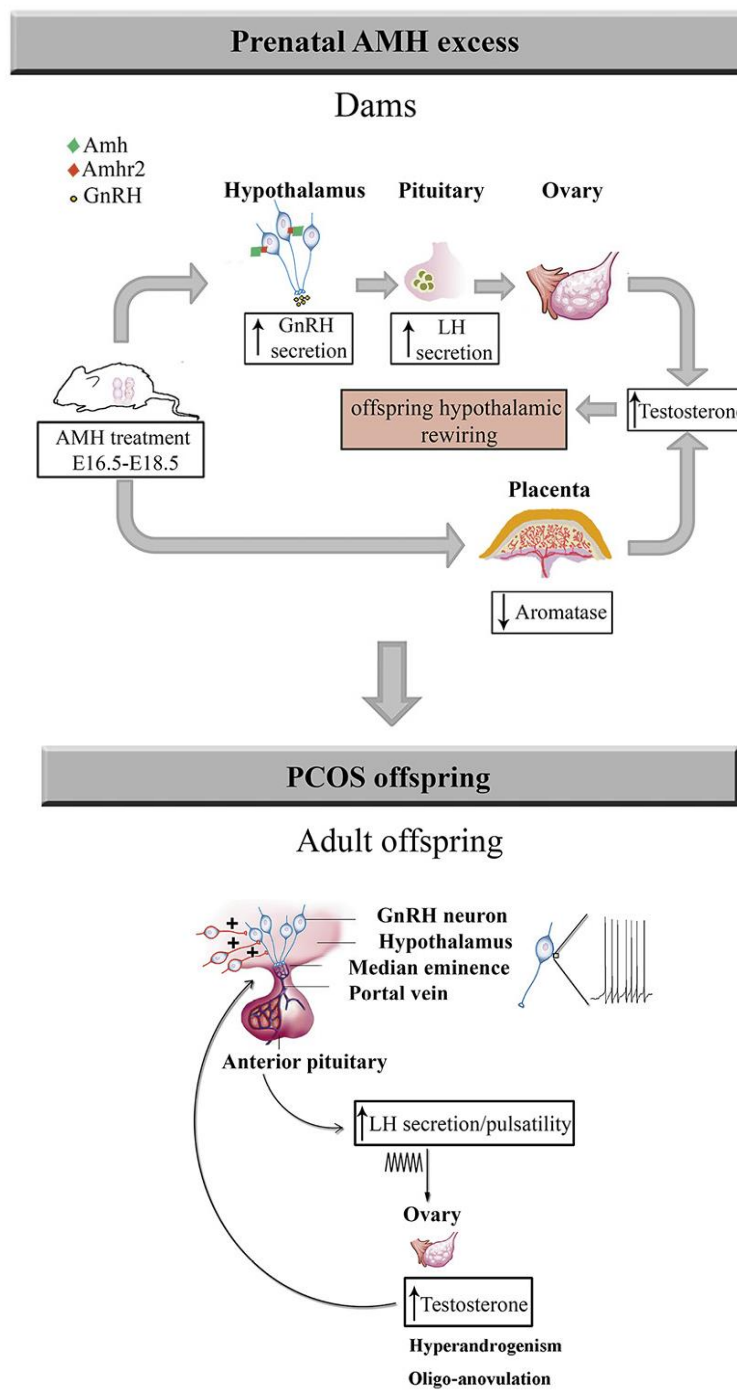


Figure 6 : Programmation prénatale du SOPK par l'AMH. D'après Barbotin *et al* [327].
Chez les souris, des concentrations élevées d'AMH pendant la gestation entraînent une augmentation de la pulsativité de la GnRH et de la LH, responsable d'une hyperandrogénie gestationnelle. L'excès de LH maternelle seul ou en association avec l'AMH entraîne une diminution de l'aromatase placentaire, augmentant la testostérone biodisponible. L'augmentation de la testostérone entraîne une cascade d'évènements chez la descendance conduisant à une augmentation de l'excitabilité neuronale hypothalamique. Chez la descendance devenue adulte, les souris présentent une augmentation des afférences excitatrices entraînant une augmentation de l'excitabilité des neurones à GnRH. L'hyperactivité des neurones à GnRH stimule alors la stéroïdogénèse ovarienne, et participe au cercle vicieux observé dans le SOPK en contribuant en l'inhibition du rétrocontrôle négatif de l'œstrogène et de la progestérone sur la LH.

Le traitement prénatal par l'AMH entraîne une multiplication par trois des taux de testostérone chez les mères gestantes. Cette augmentation est probablement responsable d'un recâblage des circuits hypothalamiques fœtaux (Figure) en raison de l'augmentation d'appositions excitatrices sur les neurones de la GnRH conduisant finalement à l'acquisition de défauts neuroendocriniens et reproductifs chez la progéniture.

L'androgénisation maternelle dépendante de l'AMH est probablement le résultat d'une double action de l'AMH chez les mères gestantes: (i) une action centrale exacerbant la stéroïdogénèse ovarienne induite par la GnRH et la LH et (ii) une inhibition de l'expression de l'aromatase placentaire induite par l'AMH, entraînant une augmentation de la biodisponibilité de la testostérone. Chez l'homme, il a notamment été démontré que l'AMH modifiait l'activité enzymatique de la synthèse des hormones stéroïdiennes [313], et il a été rapporté que les femmes atteintes de SOPK présentaient une réduction de leur activité aromatase placentaire et une activité stéroïdogène accrues [260]. La plupart des femmes atteintes du SOPK présentant une hyperandrogénie pendant la grossesse [312,328], mais la cause de cette HA reste énigmatique. Par ailleurs, il existe une corrélation entre les taux de testostérone pendant la grossesse et les taux d'AMH [326].

Nos travaux récents soulèvent l'hypothèse intrigante de savoir si l'hyperandrogénie gestationnelle retrouvées chez les femmes atteintes du SOPK pourrait être liée à des taux élevés

d'AMH pendant la grossesse en rapport avec une diminution de l'activité de l'aromatase placentaire.

Une autre découverte importante qui ressort de cette étude concerne le fait que l'hyperandrogénie prénatale dépendante de l'AMH entraîne une hyperactivité des neurones GnRH persistante chez la progéniture à l'âge adulte (Figure 6). Le SOPK pourrait impliquer une dérégulation de l'activité neuronale des neurones à GnRH / et de leur sécrétion pouvant être à l'origine des anomalies neuroendocriniennes qui accompagnent les troubles gonadiques dans ce syndrome.

OBJECTIFS

Jusqu'à présent, le SOPK était principalement considéré comme une pathologie gonadique, mais il existe de plus en plus de preuves d'une possible implication du système nerveux central ou d'interactions avec ce dernier [46]. En effet, l'AMH, dont les taux circulants sont anormalement élevés dans le SOPK, pourrait contribuer aux altérations hormonales et gonadiques observées dans le SOPK en affectant de manière centrale l'excitabilité des neurones à GnRH conduisant aux anomalies neuroendocriniennes qui caractérisent le syndrome [198]. Il a notamment été mis en évidence récemment que les neurones à GnRH murins et humains exprimaient le récepteur spécifique à l'AMH (AMHR2), et que d'autre part l'AMH induisait la sécrétion de LH en stimulant l'activation de la sécrétion de neuropeptides dans les neurones à GnRH [134]. Par ailleurs, il est également prouvé que les cellules épendymogliales spécialisées appelées tanocytes entourant les terminaisons des neurones à GnRH expriment également l'AMHR2 [134]. Or, ces tanocytes sont responsables de la plasticité neuro-structurale de l'hypothalamus. Ces cellules présentent des réarrangements structurels au cours des différentes phases du cycle ovulatoire qui sont d'une importance cruciale pour la régulation de la sécrétion de GnRH [172]. Chez les rates, dans des conditions impliquant une faible concentration en gonadotrophines en diestrus, les terminaisons nerveuses sécrétant de la GnRH sont complètement entourées par les tanocytes. Ce phénomène empêche l'accès direct de la GnRH aux vaisseaux portes pituitaires. Au contraire, au cours du pic de LH préovulatoire, en proœstrus, les tanocytes se rétractent, entraînant une libération des axones piégés et l'établissement d'une relation neuro-hémale directe entre les neurones à GnRH et l'espace péri-capillaire [172]. Ainsi, chez la femme adulte, avant le pic pré-ovulatoire de la LH, la rétraction des tanocytes pourrait permettre la juxtaposition des terminaisons nerveuses des neurones à GnRH avec l'espace péri-capillaire adjacent de la glande pituitaire. Ces changements morphologiques se produisent en quelques heures et sont réversibles. Des modifications transitoires de la microstructure et du métabolisme de l'hypothalamus au cours de leur cycle menstruel ont notamment été mis en évidence chez des femmes sous contraception oestro-progestative en utilisant une approche indirecte par résonance magnétique métabolique IRM [195].

L'AMHR2 étant exprimé par les tanocytes, nous avons émis l'hypothèse qu'il pourrait exister une modification de la plasticité structurale de l'hypothalamus impliquant les tanocytes dans la physiopathologie du SOPK. Cette plasticité pourrait notamment contribuer à l'augmentation des taux de GnRH et de LH. L'AMH pourrait également agir indirectement sur les neurones de la

GnRH via des tanocytes, en se liant à son récepteur (AMHR2), elle induirait une rétraction du pied tanocytaire, rendant l'espace péri-capillaire plus accessible, ce qui faciliterait la sécrétion de GnRH.

Ainsi, le 1^{er} objectif expérimental est de déterminer si une AMH élevée pourrait être responsable de la rétraction de la couverture de tanocyte conduisant à une sécrétion accrue de GnRH / LH dans le SOPK. Le 1^{er} objectif consiste à utiliser des études de microscopie électronique pour évaluer chez des rongeurs si l'AMH peut agir directement sur des tanocytes et si la plasticité neuro-structurale est différente entre des souris SOPK et des souris témoins.

D'autre part, l'hyperactivité de la GnRH dans le SOPK semble également être le reflet d'une augmentation de l'activité de circuits neuronaux hypothalamiques (hors GnRH) et particulier des circuits GABAergiques [198]. Afin de savoir si l'activité neuronale hypothalamique était différente entre des femmes SOPK et femmes témoins et si cette activité contribue une augmentation de la GnRH chez les femmes atteintes de SOPK, nous avons utilisé une approche par imagerie (spectroscopie par résonance magnétique).

Notre 2^{ème} objectif repose sur une étude clinique chez des femmes SOPK et des femmes témoins. Nous avons ainsi comparé les concentrations en métabolites cérébraux dans l'hypothalamus et notamment en N-acétyl aspartate qui reflète la viabilité/activité neuronale entre des femmes SOPK et des femmes témoins de poids et d'âge similaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Animaux

Tous les animaux utilisés (Rats Sprague Dawley et souris C57BL / 6J (Charles River, USA)) ont été hébergés dans des conditions spécifiques en l'absence d'agent pathogène dans une salle à température contrôlée (de 21 ° C à 22 ° C) avec un cycle lumière / obscurité de 12 h.

Des souris C57BL / 6J ont été utilisées pour les expériences d'immunohistochimie, l'analyse des transcrits par PCR quantitative, et l'étude ultra-structurale en microscopie électronique. Les souris Z / EG^{loxP-βgeo} / + (LacZ / EGFP) ont déjà été caractérisées précédemment [329]. Des rates Sprague Dawley (Janvier, Saint-Berthevin, France) pesant entre 250 à 300 g ont été utilisées pour la réalisation des Western Blot à partir des explants d'éminence médiane et l'analyse ultra-structurale en microscopie électronique. Les souris exprimant la protéine verte fluorescente (GFP) sous le contrôle du promoteur de la kisspeptine (kisspeptine::GFP) ont été généreusement fournies par le Dr. R. Steininger (Institut of de technologie de Karslrhue, Eggenstein-Leopoldshafen , Allemagne).

Des frottis vaginaux ont été réalisés quotidiennement et seuls les animaux (rates ou souris) ayant présenté au moins deux cycles œstraux consécutifs de 4 jours ont été utilisés pour les expériences. Tous les sacrifices ont été réalisés par décapitation lorsque les rongeurs étaient en dioestrus de leur cycle œstral.

Le cycle des rongeurs est composé de 4 stades (proœstrus, œstrus, métaœstrus et dioestrus) et dure 4 à 5 jours en moyenne. L'analyse du frottis vaginal permet de différencier ces différentes phases du cycle. La phase de proœstrus correspond à la phase de maturation folliculaire et est reconnaissable par la prédominance de grandes cellules rondes nucléées, cette phase dure quelques heures. L'œstrus qui fait suite à la phase de proœstrus, correspond à l'ovulation et est caractérisée par la présence d'un grand nombre de cellules épithéliales squameuses cornées en grappes. La phase de métaœstrus (aussi appelée dioestrus 1) correspond à la phase faisant immédiatement suite à l'ovulation. Elle est caractérisée par la présence de cellules épithéliales cornées, de leucocytes et de cellules rondes. La phase de dioestrus est définie par la prédominance de leucocytes dans le prélèvement vaginal.

Ces 4 phases sont liées à l'imprégnation hormonale. La phase de dioestrus correspond à la phase du cycle œstral où les sécrétions des gonadotrophines sont les plus faibles.

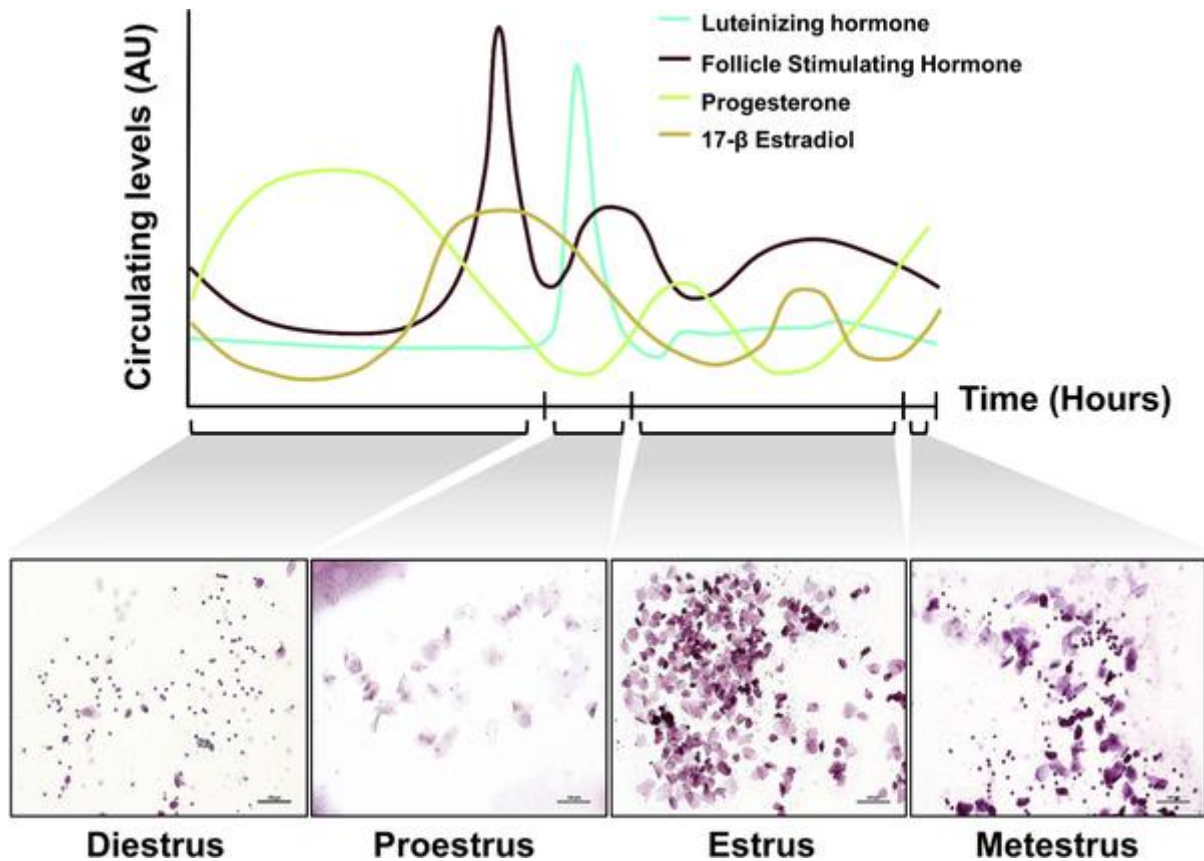


Figure 1 : Relation entre les concentrations d'hormones circulantes, le stade du cycle œstral et les résultats cytologiques des frottis vaginaux tout au long du cycle chez la souris. D'après Wallace *et al.* [330]

2. Culture cellulaire

Les cultures cellulaires de tancytes ont été réalisées selon le protocole précédemment décrit [331]. Des cultures primaires de tancytes ont été préparées en utilisant des éminences médianes disséquées à partir de cerveaux de rats sacrifiés à l'âge de 10 jours par décapitation. Après une phase de croissance de 8 à 10 jours dans des flasques de culture de 75 mL contenant un milieu DMEM-F-12 enrichi en glucose et supplémenté avec 10% de sérum bovin, 1% de L-glutamine et 1% de pénicilline/streptomycine, le milieu de culture cellulaire a été renouvelé jusqu'à ce que les cellules atteignent une confluence de 90%.

Pour l'immunohistochimie, les cellules ont étéensemencées dans des plaques à six puits sur des lamelles couvertes de poly-D-lysine (1mg / L).

3. Traitement prénatal des souris gestantes par l'AMH (PAMH)

Des souris adultes gestantes C57BL6 / J (B6) âgées de 3-4 mois ont été injectées quotidiennement par voie intrapéritonéale (ip) du 16,5^{ème} à 18,5^{ème} jour embryonnaire (E) avec 200 μ L d'une solution contenant respectivement: 1) une solution saline tamponnée au phosphate 0,01 M (PBS, pH 7,4, groupe 1=souris témoins traitées en période prénatale), 2) PBS avec 0,12 mg/Kg / j d'AMH (AMH_C, R & D Systems, rhMIS 1737-MS-10, groupe 2 : souris traitées par de l'AMH en période prénatale) .

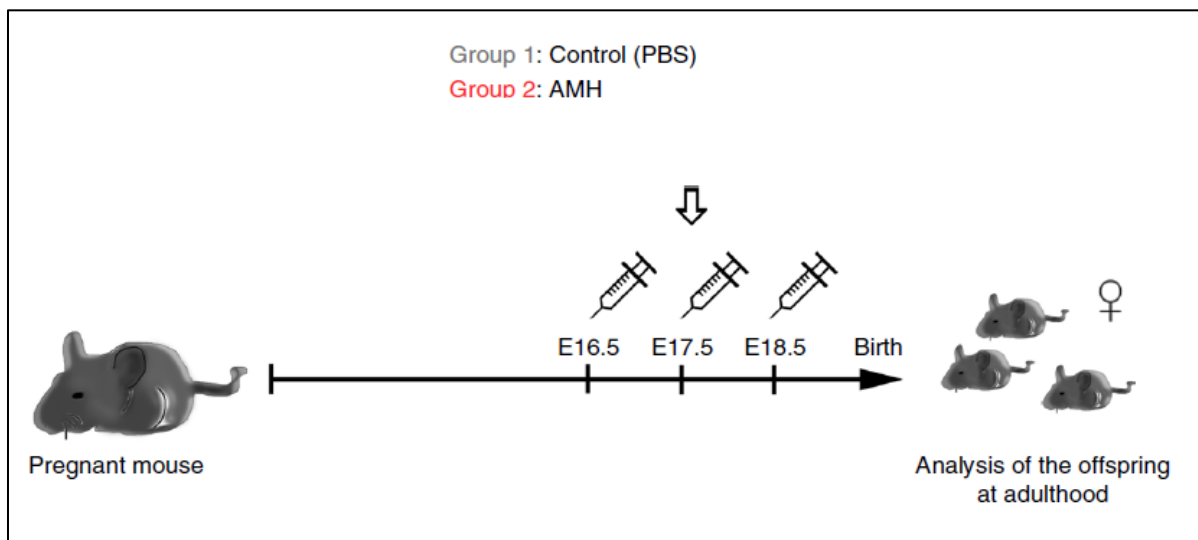


Figure 2 : Représentation schématique du protocole d'injection d'AMHc conduisant au modèle de souris SOPK appelé modèle « PAMH » (d'après Tata *et al.* [198])

4. Injection de Tat-Cre et isolement des tancytes par tri cellulaire

Des souris femelles *tdTomato*^{loxP/+} (âgées de 3 à 6 mois) ont été placées dans un cadre stéréotaxique (Kopf Instruments, Californie, USA) sous anesthésie (isoflurane) et une trépanation a été effectuée en respectant les coordonnées stéréotaxiques (1,7 mm en arrière du Bregma). Une seringue Hamilton de 10 μ l a été lentement insérée dans le troisième ventricule (5,6 mm de profondeur par rapport à la dure-mère) et 1,5 μ l de protéine de fusion Tat-cre (2,1 mg/ml) a été injecté à l'aide d'une pompe à perfusion pendant 5 min.

Les éminences médianes issues de souris femelles *tdTomato*^{loxP/+} (3 à 6 mois, n=6) ayant reçu une injection de Tat-Cre ont été microdisséquées et dissociées de façon enzymatique à l'aide de papaine (Worthington, Lakewood, NJ, USA), afin d'obtenir des suspensions de cellules indépendantes. Le tri cellulaire a été réalisé en utilisant un cytomètre de flux équipé d'un trieur de cellules EPICS ALTRA (Beckman Coulter, Inc.). Le tri cellulaire était basé sur les mesures de fluorescence de la tdTomato (longueur d'onde d'excitation : 488 nm; et longueur d'onde de détection: bande passante à 675 ± 20 nm) en comparant les suspensions cellulaires d'animaux exprimant la tomato (tdTomato-positif) et les suspensions cellulaires sauvages. Pour chaque animal, 5 000 à 8 000 cellules tomato-positives ont été triées directement dans 10 µL de tampon d'extraction contenant 0,1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) et 0,4 U/µl de RNase OUT TM (Life Technologies).

5. Polymerase Chain Reaction quantitative (qPCR)

L'extraction de l'ARN issus des tanocytes triés a été réalisée à l'aide de Trizol (ThermoFisher Scientific, n ° de catalogue 15596026) et du kit RNeasy Lipid Tissue Mini (Qiagen; n ° de catalogue 74804) en suivant les instructions du fabricant. Pour l'analyse de l'expression des gènes, les ARN messagers (ARNm) obtenus à partir des tanocytes de souris ont été soumis à une rétrotranscription à l'aide de la transcriptase inverse SuperScript® IV (Life Technologies) afin d'obtenir l'ADN complémentaire. Afin d'obtenir une quantité minimale d'ADN nécessaire à la réalisation d'une qPCR (1µg/µL), une étape de pré-amplification préalable à la qPCR a été effectuée à l'aide du kit Taqman Pre Amp Mastermix (ref : 4488593).

La PCR quantitative a ensuite été réalisée avec les produits de pré-amplification grâce au kit de PCR en temps réel rapide 7900HT d'Applied Biosystems TaqMan® composé d'amorces spécifiques à la cible et de sondes s'hybridant spécifiquement à leur séquence complémentaire entre les sites de liaison de l'amorce sens et antisens : Amhr2 (AMHR2-Mm00513847_M1); Amh (Amh-Mm00431795_G1); Alk2 (Acvr1-Mm001331069_M1); Alk3 (Bmpr1a_Mm00477650_M1); Alk6 (Bmpr1b_Mm003023971_M1); Actb (Actb_Mm00607939_S1); r18s (18s_Hs99999901_S1).

Les résultats de qPCR ont été analysés à l'aide des logiciels SDS 2.4.1 et Data Assist 3.01 (Applied Biosystems). Les valeurs sont exprimées par rapport aux valeurs de contrôle (cellules tomato-négatives), selon le cas, définies par 1.

6. Immunohistochimie

Les souris adultes femelles (P60-P90) ont été anesthésiées avec 100 mg/kg de kétamine-HCl et 10 mg/kg de xylazine-HCl, puis perfusées par voie transcardiaque avec 20 ml de solution saline, suivi de 100 ml de paraformaldéhyde à 4% dans un tampon phosphate 0,1 M (PB), (paraformaldéhyde 4% / PB 0,1 M; pH 7,6). Les cerveaux ont été prélevés et immergés dans le même fixateur (post-fixation dans du paraformaldéhyde à 4%) pendant 2 h à 4 ° C et conservés une nuit dans du tampon phosphate supplémenté en saccharose à 30% pendant à 4°C. Le lendemain, les tissus ont été inclus dans un milieu d'inclusion OCT (Tissue-Tek), puis congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80 ° C jusqu'à la coupe.

Des coupes coronales de tissu cérébral de 35µm ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (cryostat Leica) pour la réalisation d'une immunohistochimie sur coupes flottantes. Afin de saturer les sites de fixations non spécifiques, les sections ont été incubées dans une solution saline tamponnée au Tris (TBS 0,05 M, pH 7,6), contenant du sérum d'âne à 10% (sérum d'âne normal; D9663; Sigma) et du Triton X-100 à 0,3% (TBS-T; Sigma, T8787) pendant 2h à température ambiante avant l'incubation avec les anticorps primaires pendant 72h à 4 ° C: anti-Amhr2 polyclonal de chèvre (1/500, AF1618, R & D systems) ou anti-AMH polyclonal de chèvre (1 /500, AF1446 R & D systems). Après rinçage au TBS, les coupes ont été incubées avec les anticorps secondaires correspondants (Life Technologies, Molecular Probes, Invitrogen). Les anticorps secondaires d'âne anti-chèvres ont été utilisés à une dilution de 1:400, [Alexa-Fluor 488-conjugated # A21206; Alexa-Fluor 568-conjugué # A10042, # A10037] pendant 90 min dans une solution d'incubation à température ambiante. Après lavages au TBS, les sections ont été incubées avec du Hoechst à 0,02% (H3569; Invitrogen) dans du TBS-T pendant 15 min à température ambiante et montées sur des lames gélatinées et recouvertes avec du milieu de montage mowiol afin de préserver la fluorescence (Sigma n ° 81381).

Concernant l'immunohistochimie pour la GFP et le c-fos, les coupes ont été lavées avec un tampon de lavage TBS à trois reprises à température ambiante, suivies puis une incubation avec une immunoglobuline IgG anti-souris AffiniPure Fab Fragment (H + L) (1/50; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd; code # 715- 007-003) et 2% de sérum de chèvre normal pendant 1 heure à la température ambiante dans une solution d'incubation (0,2% de Triton-X / 0,25% de sérumalbumine bovine). Ensuite, les coupes ont été lavées avec du TBS 0,05 M et incubées avec les anticorps primaires anti-c-Fos de souris (1/500; GeneTex, Inc .; code # 2H2) et anti-GFP de poulet (1/1 000; Aves Labs, Inc. ; Cat # GFP-1020;) dans une solution d'incubation sur 48 h à +4 ° C. Ensuite, les coupes ont été lavées avec du TBS 0,05 M et incubées avec les anticorps secondaires d'âne anti-souris Alexa Fluor 647 (1/400; Invitrogen™; cat # A31571) et d'âne anti-poulet Alexa Fluor 488 (1/ 400; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd .; code # 703-545-155) dans une solution d'incubation à température ambiante sous agitation pendant 1h30.

Le nombre total de cellules positives pour le c-Fos par section du noyau ARH dans chaque groupe a été quantifié à l'aide du logiciel Fiji (NIH). Le nombre total de cellules c-Fos-positives dans l'ARH a été quantifié et moyenné sur les sections d'ARH de chaque animal et de chaque groupe.

7. Western Blot

Les échantillons ont été chauffés à 100°C pendant 5 min après décongélation et soumis à une électrophorèse pendant 1 h à 150 V dans des gels préfabriqués à 3%- 8% de Tris-acétate ou à 35 min à 200 V dans des gels à 4%-12% de polyacrylamide-SDS MES (Invitrogen). Ensuite, les protéines ont été transférées sur des membranes de polyvinylidène difluorure (PVDF) de 0,2 µm (Invitrogen) pendant une heure à température ambiante. Les membranes sont ensuite incubées pendant 1 heure dans une solution saline tamponnée au Tris (TBS; Tris 0,05 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M) avec 0,05% de Tween 20 (TBS-T) et 5% de lait écrémé à température ambiante ou dans du TBS avec 1% de Tween 20 pendant 1 h à température ambiante. Puis, les membranes ont été exposées aux anticorps primaire (anti-AMH polyclonal de chèvre, 1 /100, AF1446 R & D systems, ou anti-Amhr2 polyclonal de chèvre, 1/400, AF1618, R & D systems) dilué dans du TBS-T avec 5% de lait pendant toute la nuit à 4 ° C en agitation douce. L'immunoréactivité a été révélée avec des anticorps secondaires correspondant conjugués à la peroxydase de raifort dans du TBS-T contenant 5% de lait écrémé pendant 1 h à température

ambiante, puis développées à l'aide d'un substrat chimiluminescent (NEL101; PerkinElmer, Boston, MA). Si nécessaire, les membranes ont été décollées (PBS; 5 min à 100 ° C) et incubées avec un anticorps polyclonal de chèvre anti-actine (1 /1000; Santa Cruz Biotechnology). L'expression protéique a été analysée par densitométrie en utilisant le logiciel Scion Image (Scion Corporation, MA).

8. Évaluation des changements ultra structuraux dans l'hypothalamus induits par l'AMH

Pour déterminer si l'AMH modifie la plasticité de l'EM où sont retrouvées les terminaisons des neurones à GnRH, des expériences *ex vivo* ont été réalisées selon les protocoles décrits précédemment [21]. Des rates pesant 250 à 300 g ont été décapitées en diœstrus. Trois et cinq animaux ont été utilisés par condition (traités, n = 3; témoins n = 5). Après extraction rapide du cerveau, les explants hypothalamiques ont été microdisséqués sans endommager les éminences médianes. Les explants ont été placés dans des plaques 12 puits et pré-incubés pendant 30 min à 37 ° C sous 5% de CO₂ dans 1 ml de liquide céphalo-rachidien artificiel dont la composition était la suivante (en mM): NaCl, 120; KCl, 3.2; NaH₂PO₄, 1.0; NaHCO₃, 26; CaCl₂, 2.5; MgCl₂, 1.0; glucose, 10 (pH 7,4, osmolarité 304 mOsm) et contenant 5 µM de tétradotoxine (l'ajout de tétradotoxine permet d'empêcher le relargage de la GnRH). Après cette pré-incubation, les tissus ont été placés dans du liquide céphalo-rachidien artificiel frais avec ou sans présence d'AMHc (1µg / ml; (rhMIS 1737-MS-10, R & D Systems) pendant une période supplémentaire de 30 min. Les explants ont ensuite été traités pour la microscopie électronique comme décrit précédemment [172,175]. En résumé, les tissus ont été fixés par immersion dans une solution de paraformaldéhyde à 2%, d'acide picrique à 0,2% et de glutaraldéhyde à 0,1% dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4, pendant 2 h à 4 ° C. Une post-fixation à l'acide osmique à 1% dans du tampon phosphate a ensuite été réalisée pendant 1 heure à température ambiante. Après déshydratation, les tissus ont été inclus dans de l'araldite. Des sections semi-fines (épaisseur de 1 à 2 µm) ont été utilisées pour approcher et identifier progressivement la partie de l'éminence médiane cible pour les études ultra-structurales, correspondant à la zone où la tige hypophysaire se distingue de la base de l'hypothalamus mais y reste attachée par le système vasculaire porte hypophysaire [172]. Cette zone ne s'étend pas au-delà de 20 µm, et contient un nombre élevé de fibres à GnRH. Pour l'immunomarquage de

la GnRH, des coupes ultrafines (de 80 à 90 nm d'épaisseur) ont été recueillies sur des grilles de 100 mesh recouvertes de Parlodion 0,8% / acétate d'isoamyle (EMS, Fort Washington, PA). Ces coupes ont été traitées en utilisant la procédure décrite précédemment [172]. Après un traitement préliminaire par peroxyde d'hydrogène (10%; 8 min) et une étape de blocage dans du TBS (Tris 0,1 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M) contenant 1% de sérum de chèvre et 1% de sérum albumine bovine (10 min à la température ambiante), les grilles ont été mises à flot sur une goutte contenant les réactifs et les solutions de lavage suivants: (1) anticorps anti-GnRH de lapin (dilué au 1/10000) dans une solution contenant la sérum albumine bovine pendant 60 h à 4 ° C, (2) une solution tampon TBS pour éliminer l'excès d'anticorps (trois rinçages pendant 10 min), (3) une solution contenant des anticorps de chèvre anti-lapin marquées à l'or colloïdal (18 nm) (Jackson ImmunoResearch) (dilution au 1:20 dans du TBS) pendant 90 min à température ambiante, (4) du TBS (trois rinçages pendant 10 min) et (5) de l'eau distillée (trois fois pendant 10 min). Les sections ont ensuite été contrastées avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb. La spécificité des antisérums anti-GnRH utilisés a déjà été discutée [172,332]. Les coupes ultra-minces immunomarquées ont été examinées avec un microscope électronique à transmission Zeiss 902 (Leo, Rueil-Malmaison, France) et l'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'une caméra CCD Gatan Orius SC1000 (Gatan France, Grandchamp, France). L'analyse morphométrique de chaque animal a été effectuée par un examinateur à l'aveugle. Les images numérisées ont été acquises à un grossissement initial de 12 000 × pour 10 à 15 coupes ultra-minces par animal, avec un espace de 25 coupes entre elles, afin d'éviter l'analyse répétée de la même terminaison de GnRH (le diamètre d'une terminaison à GnRH dépassant rarement 2 µm).

Toutes les terminaisons nerveuses immunoréactives pour la GnRH situées à moins de 10 µm de la lame basale parenchymateuse ont été prises en compte, cela représente ainsi plus de 100 terminaisons axonales distinctes par animal. Pour chaque terminaison à GnRH située à une distance de 10 µm ou moins de la lame basale, la distance entre la terminaison à GnRH et l'espace péri-capillaire a été mesurée. Le pourcentage de terminaisons immunoréactives (terminaisons nerveuses de GnRH) situées à moins de 1µm de l'espace péri-capillaire par rapport au nombre total de terminaisons à GnRH, ainsi que la surface occupée par les tancytes ont été rapportées pour chaque animal.

9. Évaluation des changements ultra structuraux dans l'hypothalamus chez les animaux SOPK

Afin d'étudier la plasticité neuro-structurale de l'éminence médiane *in vivo* dans un modèle animal de SOPK, nous avons effectué la même approche par microscopie électronique entre des souris SOPK (modèles PAMH [198]) et des souris contrôles. Nous avons pour cela sacrifié par décapitation des souris femelles C57BL6/J (B6) (Charles River, USA) en diœstrus (P60-P90) et des souris contrôles en diœstrus. Nous avons ensuite disséqué l'éminence médiane sous contrôle de la loupe binoculaire puis immédiatement fixé les explants dans une solution de paraformaldéhyde à 2%, d'acide picrique à 0,2% et de glutaraldéhyde à 0,1% dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4, pendant 2 h à 4 ° C. Ensuite, les mêmes étapes que décrite ci-dessus ont été effectuées pour la préparation des coupes pour analyse en microscopie électronique.

Pour chaque animal (PAMH n=3, contrôles n= 5), le pourcentage de terminaisons à GnRH situées à moins de 1µm de l'espace péri-capillaire par rapport au nombre total de terminaisons à GnRH et la surface occupée par les tancytes ont été rapportés. Le nombre de particules d'or colloïdal par µm² a été jugé proportionnel à la quantité de GnRH contenu dans chaque terminaison [332]. Ce ratio a donc été utilisé pour effectuer la semi-quantification du neuropeptide et rapporté pour chaque animal.

10. Étude clinique chez la femme SOPK

10.1. Plan expérimental :

Il s'agit d'une étude prospective non-invasive comparant l'activité hypothalamique par une approche en imagerie par résonance magnétique (IRM) entre des femmes souffrant d'un SOPK et des contrôles volontaires indemnes de tout symptôme de cette pathologie. L'étude a été réalisée avec l'approbation du comité de protection des personnes (Identifiant de ClinicalTrials.gov: NCT03043924).

- **Les critères d'inclusion étaient les suivants.**

Toutes les femmes devaient :

- Être âgées entre 18 et 30 ans.
- Avoir un indice de masse corporelle (IMC) compris entre 18 et 30.
- Être volontaire et signer l'accord écrit de consentement éclairé.
- Être assurée sociale.
- Ne pas avoir fumé les 3 jours précédant l'étude.

Les sujets témoins devaient :

- Avoir des cycles réguliers (entre 25 et 35 jours) ET ovulatoires.
- Ne pas présenter de signes d'hyperandrogénie.

- **Les critères de non-inclusion étaient les suivants**

Ils correspondent essentiellement aux contre-indications à l'IRM, à savoir :

- Femmes enceintes.
- Claustrophobie.
- Corps étranger métallique intra-orbitaire.
- Pacemaker cardiaque ou neurologique.

Antécédents ou conditions pouvant influencer les résultats de l'IRM :

- Diabète ou dysthyroïdie.
- Prise de toxiques (tabac : consommation habituelle supérieure à 5 cigarettes / jour, cocaïne, amphétamines, opiacés).
- Femmes allaitantes.
- Femmes ayant accouché dans les 3 mois précédent la 1ère IRM.
- Pratique d'exercice physique intense (ex jogging >10km) la veille de l'IRM.
- Personne incapable de consentir, ou bénéficiant d'un régime de protection juridique (tutelle/curatelle).
- Personne présentant une allergie aux contraceptifs

- **Déroulement en pratique du protocole**

Les sujets étaient reçus en entretien par le Pr Catteau-Jonard (responsable du service de gynécologie endocrinienne du CHU de Lille), le protocole était expliqué et le consentement éclairé était recueilli, daté et signé. Un questionnaire était remis à la patiente afin de vérifier qu'elle ne présentait pas de contre-indications à la réalisation d'une IRM. Chaque sujet était ensuite convoqué dans le service d'IRM de l'hôpital Salengro pour la réalisation de l'IRM. Chaque participante a bénéficié d'un bilan sanguin et urinaire avant la réalisation de l'IRM.

- Pour les patientes SOPK, les prélèvements sanguins étaient réalisés dans le service de Gynécologie endocrinienne et Médecine de la Reproduction (Pr Catteau-Jonard, hôpital Jeanne de Flandre, CHU de Lille).
- Pour les sujets contrôles, les prélèvements sanguins étaient réalisés dans le service du Centre d'Investigation Clinique (CIC) de l'Institut Cœur-Poumon du CHU de Lille (Pr Deplanque, CIC, CHU de Lille).

Les prélèvements sanguins étaient destinés aux dosages de FSH, LH, œstradiol et d'AMH. Des dosages d'hémoglobine glyquée et de TSH étaient également réalisés pour les sujets contrôles avant l'IRM afin de ne pas inclure de sujets diabétiques ou présentant une dysthyroïdie. Ces derniers dosages étant déjà réalisés pour les patientes SOPK dans le cadre de leur bilan d'exploration diagnostic, ils n'ont pas été renouvelés le jour de l'IRM.

Le prélèvement urinaire était destiné au dépistage des toxiques (cotinine, cannabis, amphétamines, cocaïne et opiacés) par bandelette (immunochromatographie) dans les locaux du CIC pour les patientes contrôles et dans le service de gynécologie endocrinienne pour les patientes SOPK. Un test urinaire (détection de l'hCG) par bandelette était également réalisée pour toutes les participantes afin d'exclure une grossesse en cours.

Concernant les patientes témoins ou SOPK, l'IRM était réalisée soit

- Entre le 2^{ème} et le 5^{ème} jour d'un cycle ovarien naturel spontané (correspondant au début de la phase folliculaire) dans le cas où la patiente ne prenait pas de contraception oestroprogestative.
- Soit dans le cas d'un cycle artificiel (prise d'oestroprogestatifs), au 7^{ème} jour d'arrêt de la pilule. L'IRM avait lieu en pratique la veille de la reprise d'une nouvelle plaquette.

Cas particulier concernant les patientes SOPK uniquement :

- L'IRM pouvait être réalisée à n'importe quel moment du cycle pour les patientes SOPK présentant une aménorrhée >3 mois. Dans ce cas, le bilan biologique comprenait un dosage sérique de progestérone confirmant que la patiente était en phase folliculaire de son cycle.

Du fait des critères d'inclusion restrictifs concernant l'âge et l'IMC, il n'a pas été nécessaire d'apparier les patientes SOPK aux sujets contrôles.

10.2.Acquisition d'images

Toutes les IRM ont été réalisées dans le service de radiologie du CHU de Lille (service du Pr Jean-Pierre Pruvo) sur un appareil 3 teslas Philips Achieva (Philips Healthcare, Best, Pays-Bas) en utilisant une antenne tête multiéléments 32 canaux.

Des images anatomiques en haute résolution ont été acquises à l'aide d'une séquence 3D T1 écho de gradient (160 coupes sagittales, temps de répétition [TR] = 9,9 ms; temps d'écho [TE] = 4,6 ms; angle de bascule = 8 °; taille du voxel = 1 x 1 x 1 mm³, champ de vue [FOV] = 256 × 256 × 160 mm³). Une imagerie en tenseur de diffusion était également réalisée à l'aide d'une séquence de type echoplanar et avec une correction de distorsion (TR = 13 000 ms, TE = 60 ms, angle de retournement = 90 °; taille du voxel = 2 × 2 × 2 mm³, FOV = 256 × 256 mm², 132 coupes, facteur d'accélération de 2, 64 directions, valeurs de b = 0 et 1000 s / mm²). Enfin, deux séquences de spectroscopie de type PRESS ont été acquises au sein d'un volume d'intérêt centré respectivement sur l'hypothalamus et le thalamus gauches (TR = 2000 ms, TE = 37 ms, FOV = 10 × 10 × 10 mm³ et une résolution spectrale de 1,95 Hz / point).

10.3.Analyse spectrale

Les concentrations absolues en métabolites ont été obtenues à l'aide de l'algorithme de quantification LCmodel (ref). Dans la méthode LCmodel, les concentrations de métabolites sont déterminées en utilisant une combinaison linéaire des spectres individuels de chaque métabolite in vitro qui constituent la base des données in vivo. L'ensemble de la base a été acquis avec des TR longs et des TE courts pour minimiser les effets de relaxation. Seuls les voxels dans la région d'excitation ont été présentés pour l'analyse dans LCmodel sans autre traitement préalable tel que le zero-filling ou l'apodisation. L'enregistrement des pics dans

LCmodel a été réalisé en utilisant les pics principaux de glutamine/glutamate, choline, N-acétyl-aspartate et créatine observés dans le volume d'intérêt de l'hypothalamus, alors que le thalamus était utilisé comme témoin. Une fenêtre d'analyse spectrale de 3,85 ppm à 1,0 ppm a été utilisée afin d'éviter la variabilité des résultats liés aux artefacts lipidiques plus importants à 3T. Les spectres ont été inclus dans l'analyse finale sur la base de critères de qualité objectifs prédéfinis : résolution spectrale suffisante (largeur totale d'une valeur minimale de 0,07 ppm), informations suffisantes (SNR 4) et résidus résiduels répartis de manière aléatoire autour de zéro pour indiquer un ajustement raisonnable aux données. En utilisant la fenêtre d'analyse de 3,85 ppm, les écarts d'ajustement dus à la distorsion de la ligne de base due à une suppression incorrecte de l'eau ont été évités. Tous les spectres inclus dans les résultats avaient des lignes de base lisses et raisonnablement plates.

11. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de Prism 7 (logiciel GraphPad) et ont été évaluées pour déterminer leur normalité (test Shapiro-Wilk) et leur variance le cas échéant. Les données ont été comparées par le test T de Student si les valeurs suivaient une loi normale et par le test non paramétrique de Wilcoxon Mann-Whitney U lorsqu'elles n'avaient pas une distribution normale. Les différences entre deux groupes ont été considérées comme significatives lorsque la valeur de p était <0,05.

RÉSULTATS

1. Expression de l'AMH et de l'AMHR2 par les tanocytes

Nous avons dans un premier temps examiné l'expression des transcrits de l'AMH et de son récepteur (AMHR2) par les tanocytes. Comme décrit précédemment, la protéine de fusion Tat-Cre a été injectée de manière stéréotaxique dans le troisième ventricule de souris femelles *tdTomato*^{loxP/+} [333]. L'injection de la Tat-cre est responsable d'une recombinaison spécifique (de type Cre-lox) dans les tanocytes car il s'agit des seules cellules qui expriment la protéine fluorescente (tomato) Figure 1a. Ensuite, une dissociation cellulaire des explants d'éminence médiane à l'aide d'un cytomètre de flux équipé d'un trieur cellulaire (FACS) a été réalisée afin de comparer les niveaux d'expression des transcrits par qPCR.

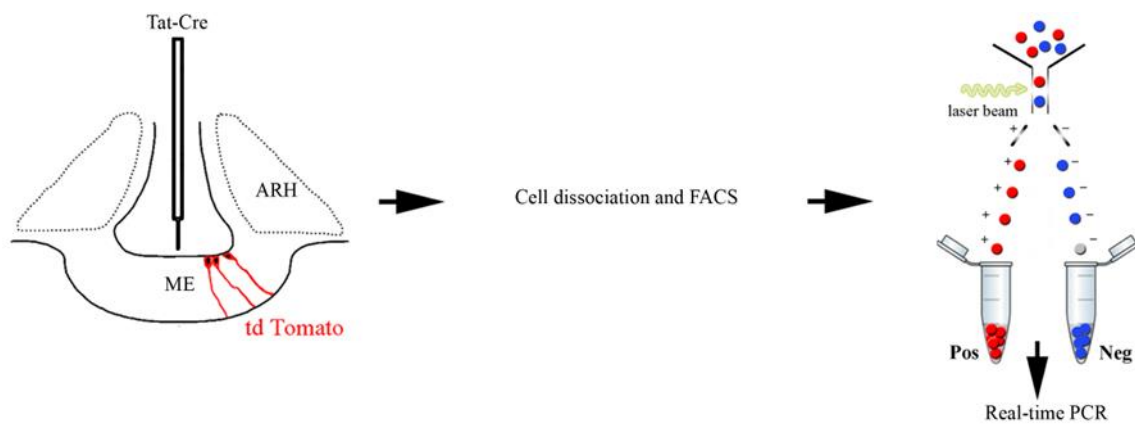


Figure 1a : Schéma représentatif du modèle expérimental permettant l'isolement de tanocytes pour la réalisation de la PCR quantitative

La qPCR a révélé que l'AMH et l'AMHR2 étaient exprimés par les cellules tomato-positives (c'est-à-dire des tanocytes) (Figure 1b). De plus, les trois récepteurs ALK (Alk2, Alk3 et Alk6), qui sont des composants du récepteur à l'AMH de type I, sont également exprimés par les tanocytes. L'expression de l'Alk2 et de l'Alk3 est d'ailleurs significativement plus élevée dans les cellules tomato-positives par rapport aux cellules tomato-négatives ($p < 0,005$ et $p < 0,05$ respectivement).

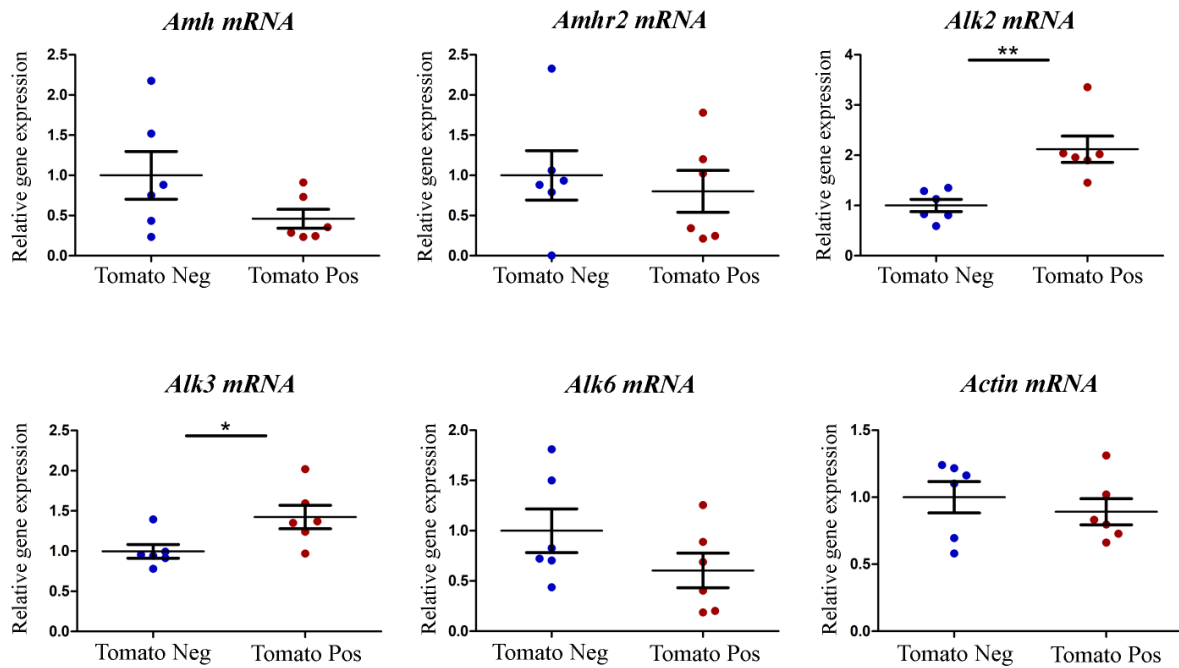


Figure 1b : Analyse par PCR quantitative de l'expression des transcrits de l'Amh, amhr2, Alk2, Alk3, et de l'Alk6 par des tanocytes triés. Comparaison à l'aide du test de Student avec $*p < 0,05$ et $**p < 0,005$.

Afin de confirmer l'expression de l'AMH et de son récepteur spécifique (AMHR2) par les tanocytes, nous avons réalisé une immunohistochimie sur des coupes de cerveau passant par le 3^{ème} ventricule et l'éminence médiane provenant de souris femelles adultes en diœstrus (Figure 1c). Nous avons confirmé que l'AMH était exprimé par l'éminence médiane (en rouge, Figure 1c) et en particulier par les tanocytes tapissant le troisième ventricule (Figure 1d). De plus, nous avons détecté une activité AMHR2-Cre en utilisant la lignée de souris Z / EG (Figure 1 e-f).

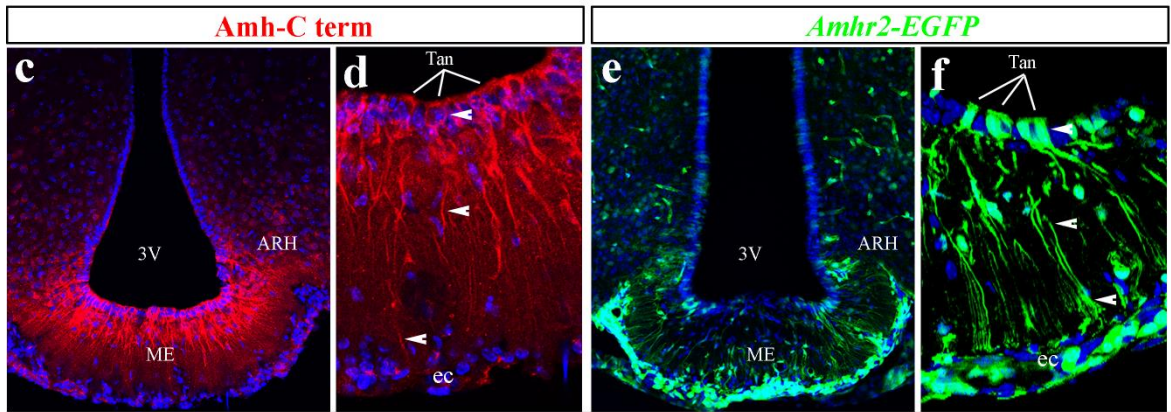


Figure 1c-f : Expression de l'AMH et de l'AMHR2 dans l'hypothalamus de souris femelles adultes *in vivo*

Pour évaluer à la fois l'expression protéique de l'AMH et de l'AMHR2, nous avons généré des cultures primaires de tanocytes à partir d'éminence médiane de rats (Figure 1g), et nous avons utilisé un Western blot pour confirmer la présence d'AMH et d'AMR2 dans des tanocytes.

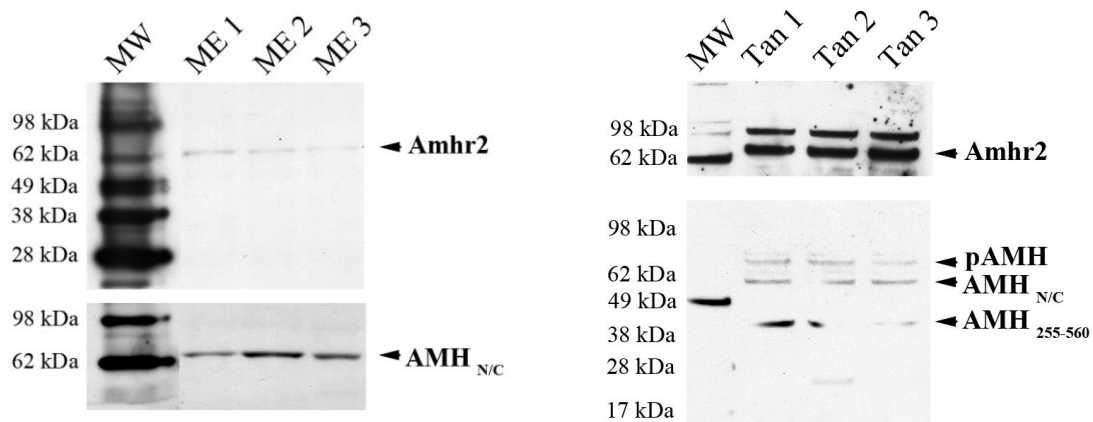


Figure 1g : Western blot mettant en évidence l'expression de l'AMH et de l'AMHR2 dans l'éminence médiane de rats et par des tanocytes issus de culture primaire (*ME* : median eminence, *TAN* : tanocytes, *MW* : molecular weight)

L'expression de l'AMH et de l'AMHR2 par les tanocytes a également été confirmée *in vitro* par immunohistochimie (Figure 1h).

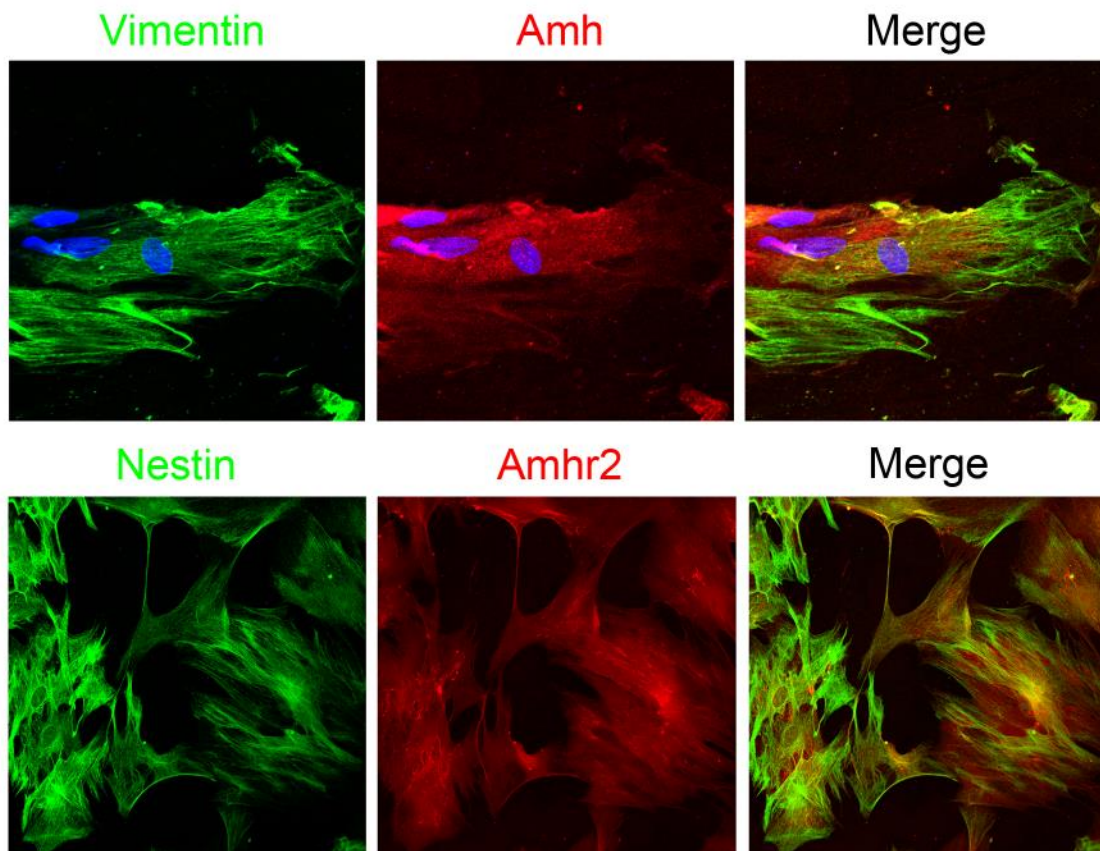


Figure 1h : Expression de l'AMH et de l'AMHR2 *in vitro* (culture primaire de tanocytes)

2. Modification de la plasticité de l'hypothalamus par l'AMH

L'AMH est capable de provoquer des modifications morphologiques des terminaisons à GnRH et de la couverture tanocytaire

Récemment, notre équipe avait montré que l'administration intracérébrale d'AMH conduisait à une augmentation soudaine (en quelques minutes) de la sécrétion de LH ainsi qu'à une augmentation de sa pulsatilité chez des rongeurs en phase de diœstrus [134]. Ainsi, comme les cellules gliales semblent être impliquées dans le contrôle de la sécrétion de la GnRH (et influent donc sur la sécrétion de LH), notre hypothèse est qu'il pourrait alors exister une

modification de la plasticité structurale dans le SOPK induite par l'AMH. Par ailleurs, les tanocytes exprimant le récepteur spécifique à l'AMH et présentant des réarrangements structurels au cours des différentes phases du cycle ovulatoire qui sont essentielles à la régulation de la sécrétion de la GnRH, nous avons souhaité comparer la plasticité morphologique de l'éminence médiane en fonction de la présence d'AMH (Figure 2a).

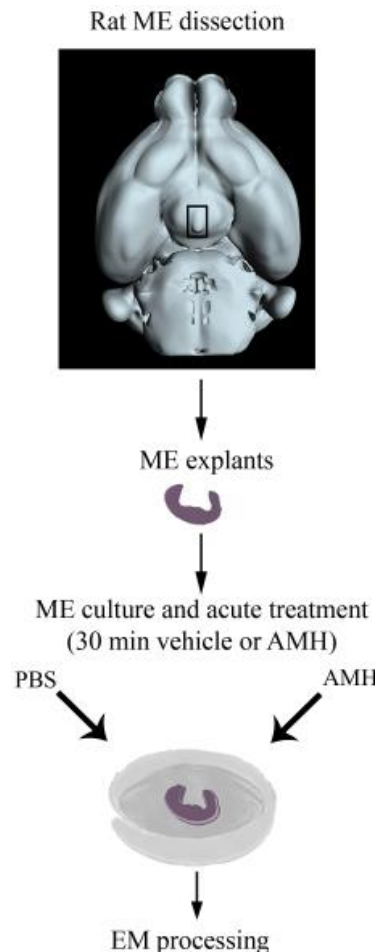


Figure 2a : Modèle expérimental permettant d'évaluer si la plasticité de l'éminence médiane est AMH-dépendante. *Pour déterminer si l'AMH pouvait agir sur les terminaisons axonales à GnRH, nous avons prélevé des explants d'éminences médianes maintenus ex vivo dans du liquide céphalo-rachidien artificiel. Les éminences médianes ont été traitées avec 1 µg ml⁻¹ d'AMH pendant 30 minutes ou avec une solution saline (PBS). Elles ont ensuite été fixées et traitées pour une analyse en microscopie électronique en utilisant un marquage à l'or colloïdal. ME : median eminence*

Nous avons observé que les terminaisons à GnRH étaient plus proche de l'espace péri-capillaire dans les explants traités par de l'AMH (Figure 2b)

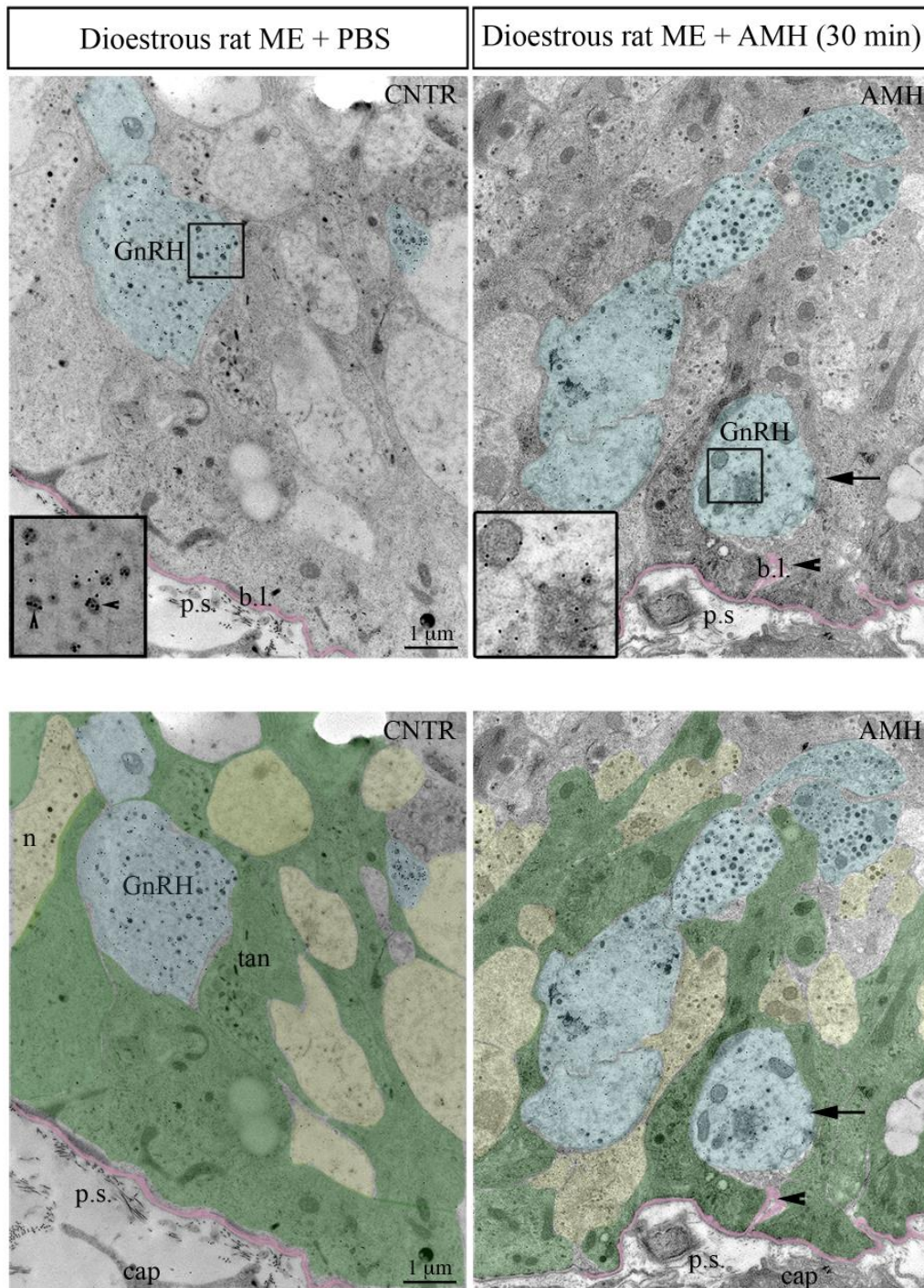


Figure 2b : Microphotographies montrant des terminaisons de neurones à GnRH issues d'explants d'éminence médiane de rates en diœstrus traitées ou non avec de l'AMH. En vert, les pieds tanycytaires ; en jaune: autres terminaisons neuronales ; en bleu : les

terminaisons à GnRH marquées aux billes d'or et en rouge: l'espace péri-capillaire. Dans le groupe traité par l'AMH, les terminaisons des neurones à GnRH (flèche) sont plus proches de l'espace péri-capillaire. Tan : tancytes ; b.l : lame basale ; GnRH : terminaisons à GnRH, n : autres terminaisons neuronales, cap : capillaires.

Nos résultats montrent une augmentation significative du pourcentage de terminaisons axonales à GnRH situées à moins de 1µm de la lame basale parenchymateuse dans le groupe traité par l'AMH par rapport aux contrôles (de 5,8% à 11,2%, test de Wilcoxon-Mann-Whitney, $p = 0,0357$) ($n=3$ pour les éminences médianes traitées par l'AMH et $n = 5$ pour les éminences médianes traitées par la solution tampon, figure 2c). Comme mentionné précédemment, le choix de la limite de 1µm pour l'analyse morphométrique quantitative était basé sur un travail précédent ayant démontré que les changements morphologiques ne se produisaient que pour la fraction des terminaisons à GnRH les plus proches de l'espace péri-capillaire, situés à moins de 1µm de la lame basale [193].

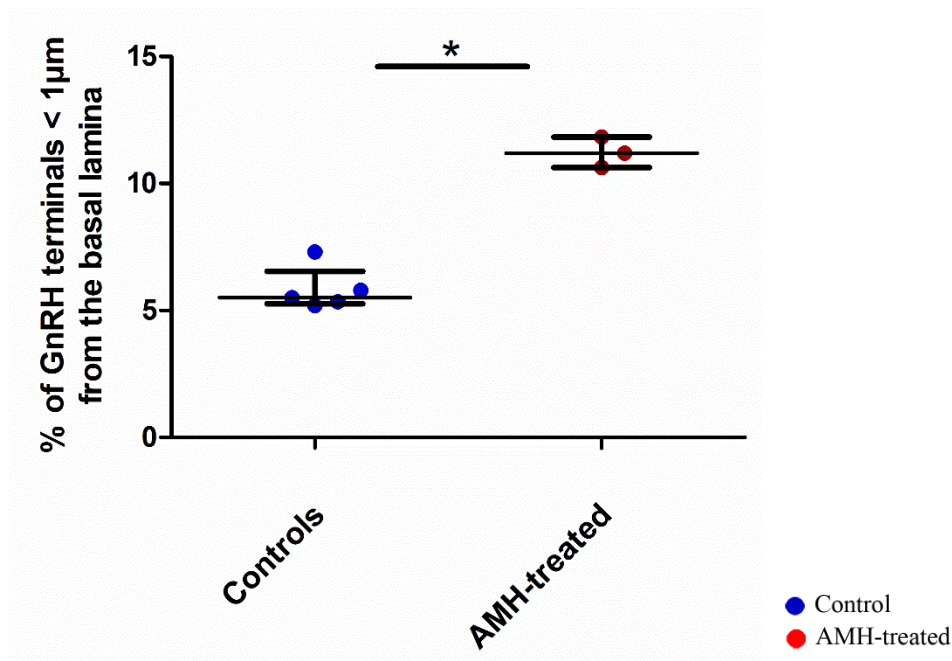


Figure 2c : Analyse comparative du pourcentage de terminaisons de neurones à GnRH situés à moins de 1µm de l'espace péri-capillaire entre des éminences médianes traitées par de l'AMH ou incubées avec une solution tampon PBS. Entre 100-150 terminaisons axonales immunoréactives pour la GnRH ont été prises en compte par animal. Les valeurs sont

représentées par la médiane et les 25-75^{ème} percentiles. Test de Wilcoxon-Mann-Whitney avec $*p < 0,05$.

Cette augmentation était concomitante d'une diminution de la surface occupée par les pieds tancytaires passant de 92% [79-98] à 72% [60-79], $p < 0,0001$. (Figure 2d).

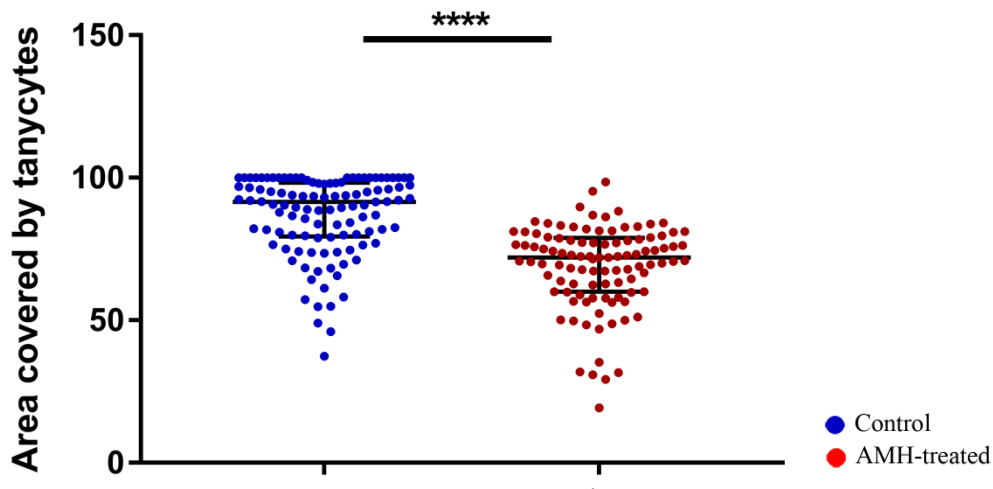


Figure 2d : Analyse comparative de la surface occupée par les tanycytes entre des éminences médianes traitées par de l'AMH ou incubées avec une solution tampon PBS (109 microphotographies ont été considérées pour le groupe témoin et 102 pour le groupe traité à l'AMH ; $p < 0,0001$). Les valeurs sont représentées par la médiane et les 25-75^{ème} percentiles.

3. Plasticité hypothalamique dans le SOPK

Comme nous avons démontré que l'AMH pouvait *ex vivo* induire une plasticité morphologique dans l'éminence médiane, nous avons ensuite exploré si une plasticité morphologique hypothalamique se produisait *in vivo* chez des souris PCOS. En effet, l'existence d'un remodelage des terminaisons des neurones à GnRH et de la couverture gliale dans le SOPK pourrait contribuer à la sécrétion accrue de GnRH vers les vaisseaux sanguins du système porte hypophysaire. Nous avons effectué la même méthodologie que décrite chez la rate, en

comparant la plasticité morphologique de l'éminence médiane entre un modèle de souris SOPK précédemment décrit (PAMH) et des souris contrôles (Figure 3a).

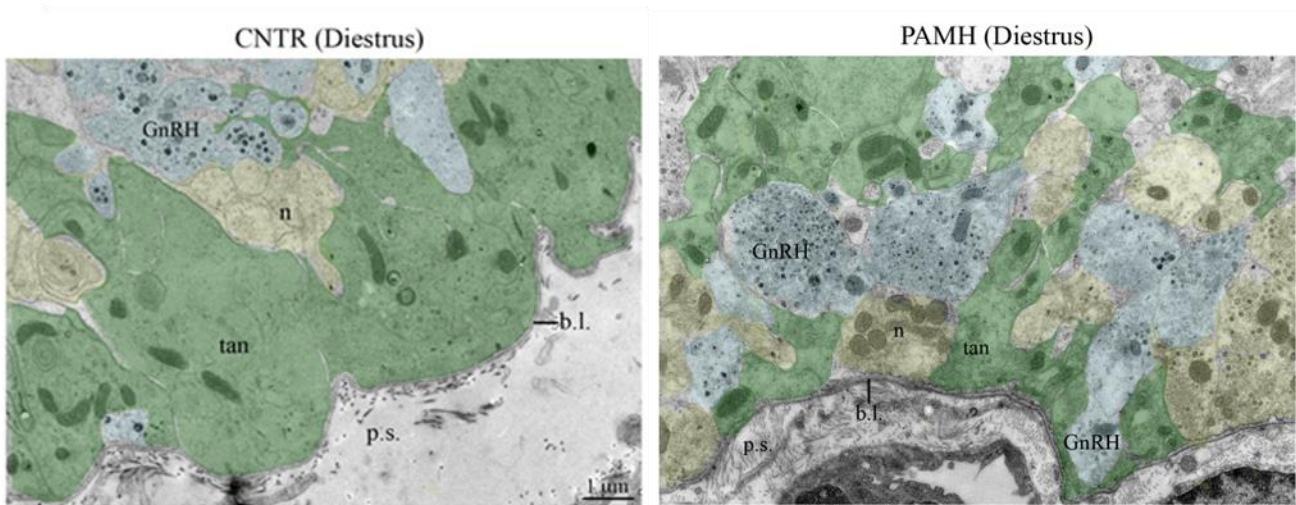


Figure 3a : Microphotographies montrant des terminaisons de neurones à GnRH issues d'explants d'éminence médiane de souris PAMH ou contrôles en diestrus. En vert, les pieds tanycytaires ; en jaune: autres terminaisons neuronales ; en bleu : les terminaisons à GnRH marquées aux billes d'or. Les terminaisons des neurones à GnRH sont plus proches de l'espace péri-capillaire chez les souris PAMH par rapport aux souris contrôles. Tan : tanocytes, b.l : lame basale ; GnRH : terminaisons à GnRH, n : autres terminaisons neuronales

Nous avons ainsi analysé et comparé les explants hypothalamiques contenant les éminences médianes dans les deux groupes et effectué une analyse morphométrique quantitative. Nous avons évalué le pourcentage de terminaux GnRH situés à $<1 \mu\text{m}$ de l'espace péri-capillaire et le pourcentage de surface occupée par des tanocytes dans la zone externe de l'éminence médiane.

De manière similaire à ce qui a été observé *ex vivo* avec le traitement par l'AMH, nous avons observé une augmentation du pourcentage de terminaisons axonales à GnRH situées à moins de $1 \mu\text{m}$ de la lame basale parenchymateuse chez les souris PAMH (passant de 5,0% pour les souris témoins à 11,5% pour les souris PAMH) ($n = 3$ pour les souris PAMH et $n = 5$ pour les témoins; 100 à 150 terminaisons d'axones immunoréactives vis-à-vis de la GnRH ont été prises en compte par explant; test de Wilcoxon Mann-Whitney, $p = 0,0357$) (Figure 3b).

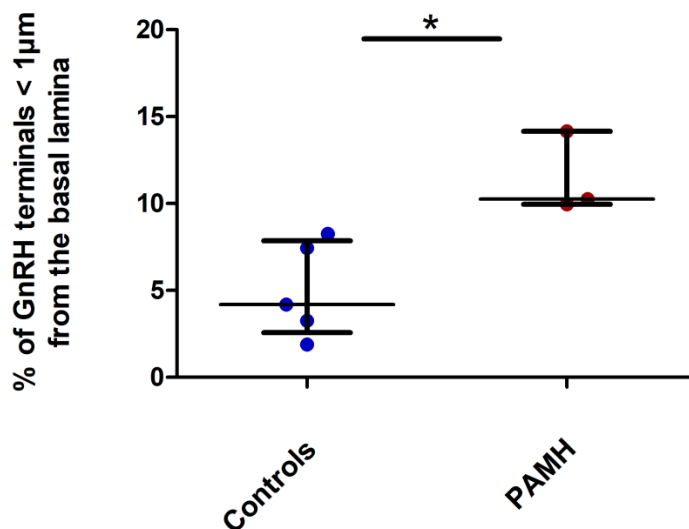


Figure 3b : Analyse comparative du pourcentage de terminaisons de neurones à GnRH situées à moins de 1µm de l'espace péri-capillaire entre des souris PAMH et des souris témoins. Entre 100-150 terminaisons axonales immunoréactives pour la GnRH ont été prises en compte par animal. Les valeurs sont représentées par la médiane et les 25-75ème percentiles, test de Wilcoxon-Mann-Whitney avec * $p < 0,05$.

Cette augmentation du nombre de terminaisons à GnRH à proximité de l'espace péri-capillaire s'accompagne également d'une diminution de la surface occupée par les pieds tancytaires chez les souris PAMH, passant de 84% [76-92] à 65% [56-74], $p < 0,0001$ (Figure 3c).

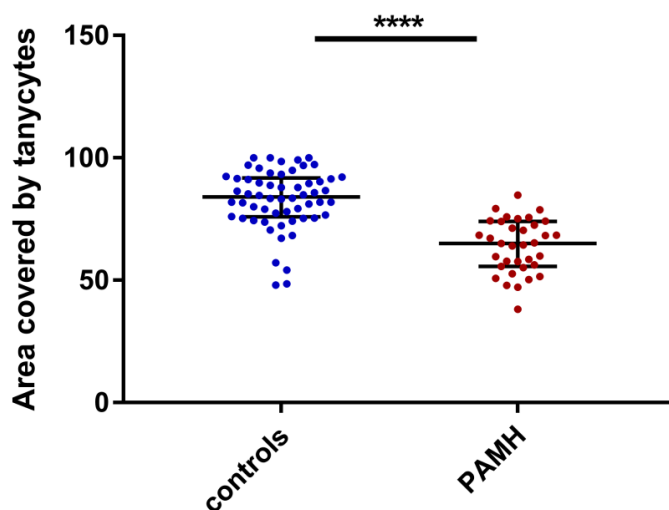


Figure 3c : Analyse comparative de la surface occupée par les tanocytes entre les souris PAMH et les souris témoins ($n=58$ microphotographies pour le groupe témoin et $n=35$ microphotographies considérées pour le groupe PAMH). Les valeurs sont représentées par la médiane et les 25-75^{ème} percentiles, test de Wilcoxon- Mann-Whitney avec $****p<0,0001$.

Ce résultat refléterait de la rétraction des pieds tanocytaires autorisant l'avancée des terminaisons nerveuses des neurones à GnRH au niveau de l'éminence médiane. En effet, nous avons démontré que le pourcentage de terminaisons à GnRH à moins de 1 μm de la lame basale était inversement corrélé au pourcentage de surface recouverte par les tanocytes ($r = -0,8$, $p = 0,015$, coefficient de corrélation de Spearman) (Figure 3d).

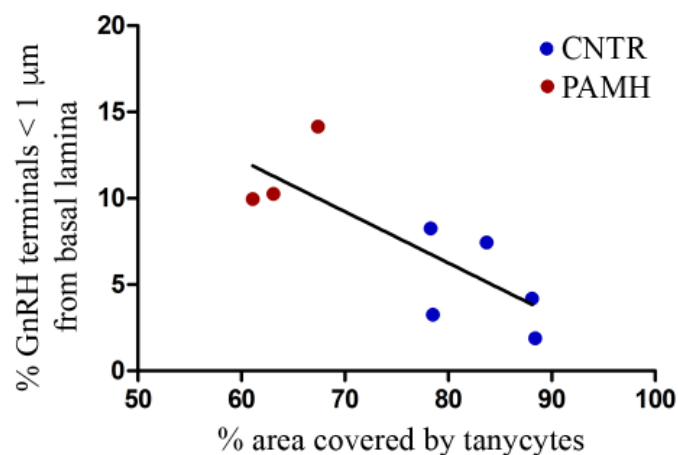


Figure 3d: Corrélation entre le pourcentage de terminaisons à GnRH situées à moins de 1 μm de la lame basale et le pourcentage de surface recouverte par les tanocytes (coefficient de corrélation de Spearman, $p<0,05$)

Pour déterminer si la plasticité hypothalamique neuro-structurale observée pourrait être associée à une augmentation de la libération de GnRH, nous avons analysée de manière semi-quantitative le contenu en grains des terminaisons nerveuses à GnRH entre les deux groupes en utilisant la même procédure que celle décrite précédemment [332]. (Figure 3e)

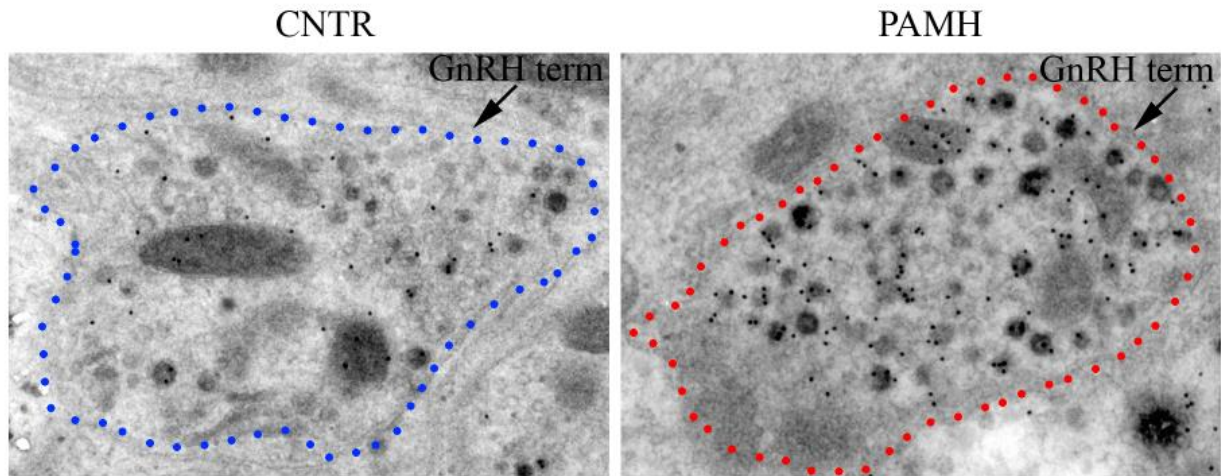


Figure 3e : Microphotographies montrant des terminaisons de neurones à GnRH marquées à l'or colloïdal issues d'explants d'éminence médiane de souris PAMH ou contrôles en diestrus.

Nous avons observé que le nombre de particules d'or de terminaison à GnRH (rapporté à la surface de la terminaison en μm^2) était significativement plus élevé chez les souris PAMH que chez les témoins (avec une médiane à 22,4 grains [15-32] contre 17,5 grains [11-27] respectivement) (Figure 3f) ($n = 3$ pour les souris PAMH représentant 682 terminaisons axonales à GnRH ; $n = 5$ pour les souris contrôles représentant 877 terminaisons à GnRH; test de Wilcoxon-Mann-Whitney, $p < 0,0001$).

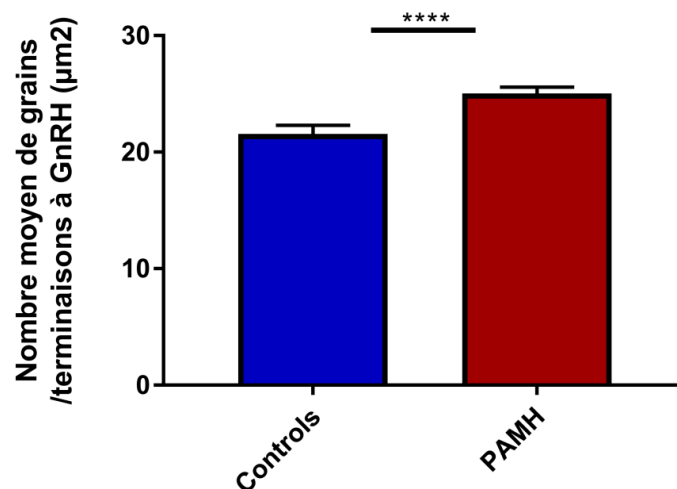


Figure 3f : Analyse comparative du nombre moyen de grains d'or par terminaison à GnRH rapportée à la surface en μm^2 entre les souris PAMH et les souris témoins. Les valeurs sont représentées par la médiane et les 25-75^{ème} percentiles. Test de Wilcoxon-Mann-Whitney, ** $p < 0,0001$).**

Ensemble, nos résultats démontrent que la plasticité morphologique de l'hypothalamus chez les souris PAMH est associée à une augmentation de la sécrétion de GnRH dans les terminaisons nerveuses. Or, il a été démontré que l'augmentation du contenu en particules d'or dans les terminaisons à GnRH était concomitante à la montée de la LH pré-ovulatoire et se produisait même quelques heures avant le pic de LH [332], suggérant que la modification de la sécrétion de GnRH dans le SOPK pourrait être le résultat de changements morphologiques ultrastructuraux hypothalamique et d'une hyperactivité neuronale.

4. SOPK et hyperactivité neuronale

En effet, notre équipe a récemment démontré que l'AMH injectée par voie intrapéritonéale augmentait de manière significative l'activité des neurones (observé indirectement par l'augmentation du nombre total de noyaux de c-Fos positifs) et le pourcentage de neurones GnRH exprimant le c-Fos dans l'OVLT hypothalamique (*organum vasculosum laminae terminalis*), ce qui montre que l'AMH périphérique peut agir de manière centrale en induisant une activation des neurones à GnRH [198]. Dans la même étude, il a été suggéré que l'hyperactivation des neurones à GnRH dans le SOPK était consécutive à une augmentation des afférences neuronales et en particulier des appositions excitatrices GABAergiques. Ces données récentes nous ont donc incité à évaluer si l'activité neuronale hypothalamique dans les régions hypothalamiques, connue pour réguler l'activité des neurones à GnRH, pourrait être modifiée entre des souris SOPK et les témoins. Nous avons évalué l'activité neuronale dans le noyau arqué, car cette région contient diverses populations neuronales (telles que les neurones GABAergiques et les neurones KNDy) impliquées dans les boucles de rétroactions des hormones stéroïdiennes gonadiques. En effet, les neurones situés dans le noyau arqué expriment des récepteurs pour les hormones stéroïdes gonadiques contrairement aux neurones de la GnRH qui n'expriment que le récepteur des œstrogènes β [46].

Pour évaluer si notre modèle de souris SOPK (PAMH) présentait une activité neuronale hypothalamique supérieure pouvant conduire à une activation neuronale des neurones à GnRH, nous avons quantifié le nombre de neurones actifs c-Fos + dans le noyau arqué (Figure 4a). Nous avons comparé le nombre de cellules immunoréactives c-Fos situées dans le noyau arqué entre les souris PAMH et les souris témoins et avons constaté que le nombre total de neurones c-Fos positifs était significativement plus élevé chez les souris PAMH que chez les souris témoins (passant de 252 à 407 ; n = 5 par groupe ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney, p = 0,0159). L'augmentation du nombre de neurones c-Fos+ concerne les régions rostrales et médiale du noyau arqué (Figure 4b). Par ailleurs, nous n'avons pas observé d'augmentation du nombre de neurones à kisspeptine quel que soit la région concernée entre les deux groupes (Figure 4c). De même, cette augmentation globale de l'activité neuronale dans le noyau arqué n'ait par contre pas le fait d'une augmentation de l'activité des neurones à kisspeptine suggérant l'implication d'une autre population neuronale (Figure 4d).

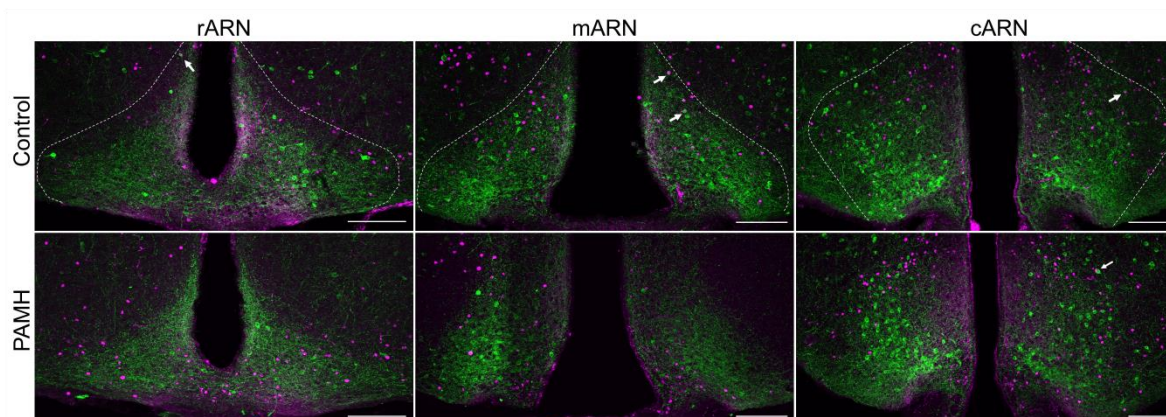


Figure 4a : Coupes coronales de cerveaux de souris femelles PAMH et témoins en diœstrus illustrant un double immunomarkage kisspeptine et c-fos dans le noyau arqué. *En vert (kisspeptine), en violet : immunomarkage pour c-fos, rARN : portion rostrale du noyau arqué, mARN : portion médiale du noyau arqué, cARN : portion caudale du noyau arqué*

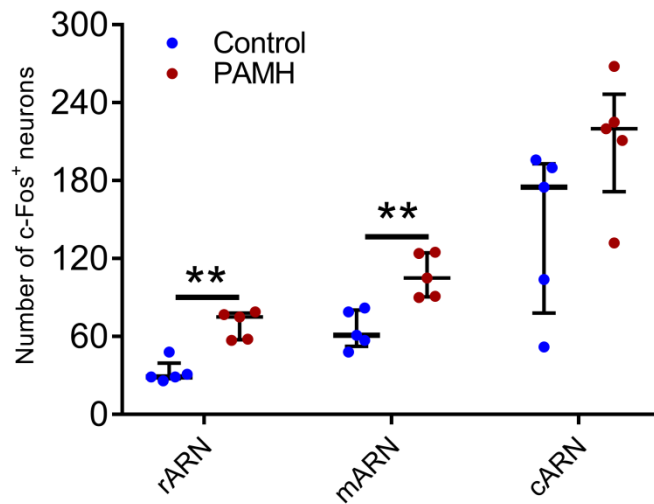


Figure 4b : Analyse comparative du nombre de neurones c-Fos+ entre des souris témoins et des souris PAMH dans différentes régions du noyau arqué. Partie rostrale, médiale et caudale du noyau arqué (respectivement rARN, mARN et cARN). Les valeurs sont représentées par la médiane et les 25-75ème percentiles. Test de Wilcoxon-Mann-Whitney. $**p < 0,005$

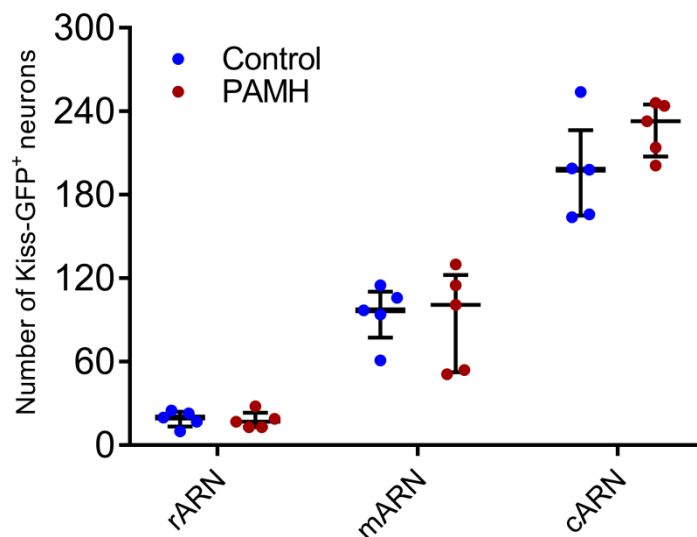


Figure 4c : Analyse comparative du nombre de neurones à kisspeptine entre des souris témoins et des souris PAMH dans la région du noyau arqué. Partie rostrale, médiale et caudale du noyau arqué (respectivement rARN, mARN et cARN). Les valeurs sont représentées par la médiane et les 25-75ème percentiles. Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

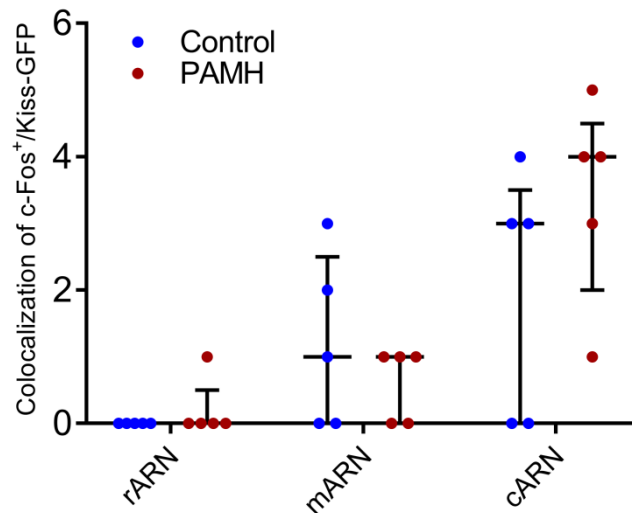


Figure 4d : Analyse comparative du nombre de neurones coexprimant le c-Fos et la kisspeptine entre des souris témoins et des souris PAMH dans la région du noyau arqué. Partie rostrale, médiale et caudale du noyau arqué (respectivement rARN, mARN et cARN). Les valeurs sont représentées par la médiane et les 25-75ème percentiles. Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Ensemble, ces dernières investigations montrent que l'hyperexcitabilité de la GnRH rencontrée chez des modèles de souris SOPK semble être la conséquence d'une stimulation puissante exercée par les neurones du noyau arqué. Il restait à démontrer si cette augmentation de l'activité du noyau arqué se produisait également chez la femme.

5. Le SOPK chez les femmes et hyperactivité de l'hypothalamus

Les techniques d'IRM utilisant la spectroscopie RMN de proton (MRS) ont été utilisées comme une approche non invasive pour comparer l'activité hypothalamique et thalamique neuronale chez des femmes SOPK et chez des femmes témoins. Les caractéristiques cliniques et les résultats des dosages hormonaux des patientes incluses (15 témoins et 13 femmes présentant un SOPK) sont présentées dans le tableau n° 1.

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques et hormonales des patientes SOPK et témoins inclus

	Témoins (n=15)	SOPK (n=13)	<i>p</i>
Age (années)	26,04 ± 2,45	24,06 ± 4,22	0,13
IMC (kg/m ²)	22,62 ± 2,74	21,77 ± 2,48	0,4
FSH (UI/L)	5,00 ± 1,35	5,10 ± 1,14	0,83
LH (UI/L)	3,8 (3,0-4,6)	4 (2,4-7,9)	0,69
FSH/LH	1,38 (1,05-1,57)	0,9 (0,62-1,93)	1
Oestradiol (pg/mL)	32 (20-44)	41 (27-47)	0,36
AMH (pmol/L)	23,16 ± 11,48	66,64 ± 34,19	<0,0001

Les valeurs sont représentées par la moyenne et la déviation standard ou la médiane et les 25-75^{ème} percentiles.

Comme attendu, les concentrations d'AMH sont plus élevées chez les femmes SOPK par rapport aux témoins. L'IMC des femmes SOPK n'est pas significativement plus élevé que chez les témoins en raison des critères d'inclusion du protocole (inclusion de patientes ayant un IMC < 30).

Comme décrit précédemment [334], des analyses spectroscopiques mesurant les concentrations en métabolites cérébraux en mouvement libre à l'aide d'un voxel ont été effectuées à la fois dans l'hypothalamus et dans le thalamus, et les données ont été normalisées avec la créatine, selon une approche quantitative relative (Figure 5a).

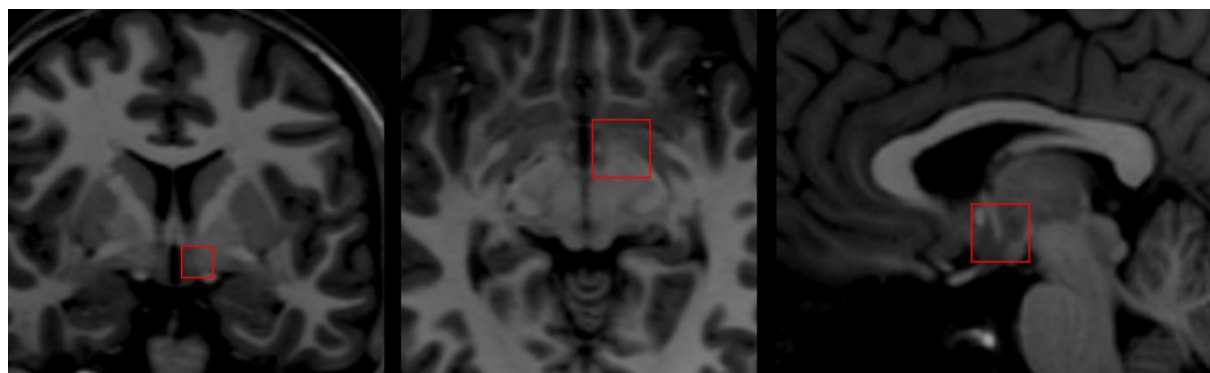


Figure 5a : Localisation du voxel utilisé pour l'analyse en spectroscopie au niveau de l'hypothalamus en coupe coronale et sagittale. Le voxel est représenté par le carré rouge et mesure 1cm³

Nous avons comparé les ratios de N-acétyl-aspartate (NAA) / créatine (CREA) entre les patientes SOPK et les témoins. Nous n'avons observé aucune différence dans le rapport NAA/CREA dans la zone de contrôle thalamique entre les femmes SOPK et les femmes témoins (Figure 5b). Cependant, nous avons constaté que le ratio NAA / CREA dans l'hypothalamus était plus élevé chez les femmes atteintes de SOPK par rapport aux témoins ($p=0,0129$). Ces résultats de spectroscopie suggèrent une hyperactivité hypothalamique neuronale chez les femmes atteintes du SOPK, qui pourrait contribuer à une augmentation de la sécrétion de GnRH, car le NAA est considérée comme un marqueur de l'activité neuronale.

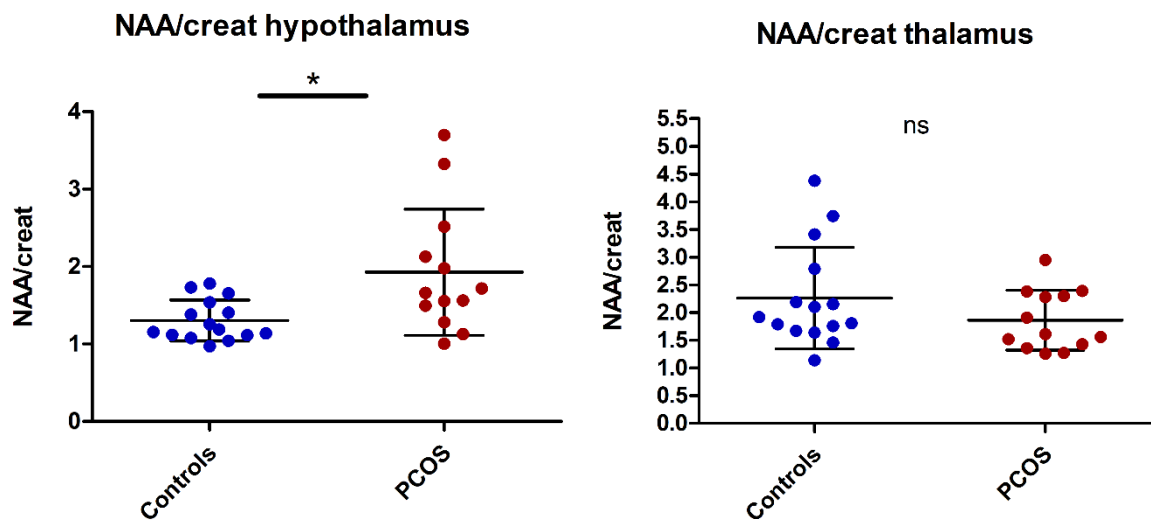


Figure 5b : Analyse comparative des ratios de métabolites de N-acétyl-aspartate/créatine entre femme témoins et femmes SOPK. NAA : N-acétyl-aspartate, Creat : créatine. Les valeurs sont représentées par la médiane et les 25-75ème percentiles. Test de Wilcoxon-Mann-Whitney, * $p < 0,05$.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons finalement souhaité déterminer si la sécrétion était GnRH différente entre les femmes SOPK et les témoins. Nous avons pour cela mesuré et comparé la concentration sérique de GnRH (ng/ml) par chromatographie en phase liquide à haute pression - spectrométrie de masse à haute résolution (Nano-HPLC-HRMS) entre un groupe de femmes SOPK et des témoins ayant bénéficié d'un bilan hormonal d'exploration de

l'infertilité en hôpital de jour dans le service de gynécologie endocrinienne du CHU de Lille. Les résultats du bilan hormonal sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Profil hormonal et caractéristiques cliniques des patientes témoins et SOPK ayant bénéficié d'un dosage de GnRH

	Témoins (n=15)	SOPK (n=8)	p
Age (années)	30,1 ± 1,2	31,1 ± 2,3	0,66
IMC (kg/m ²)	30,1 [23,1-33,5]	22,1 [21,5-31,75]	0,17
Oestradiol (pg/mL)	29 (26-31)	43 (39,5-44)	0,0327
FSH (UI/L)	5,36 ± 1,02	4,87 ± 1,20	0,313
LH (UI/L)	3,3 ± 1,36	6,02 ± 3,52	0,0139
FSH/LH	1,85 (1,46-2,00)	0,88 (0,76-0,97)	0,0041
Testostérone (ng/mL)	0,29 ± 0,09	0,47 ± 0,16	0,0032
Androsténédione (ng/mL)	0,75 ± 0,24	1,63 ± 1,10	0,0068
AMH (pmol/L)	19,3 ± 7,26	84,02 ± 49,85	<0,0001
GnRH (ng/mL)	1,70 ± 0,03	2,72 ± 1,27	0,0045

Nos résultats montrent que des concentrations plus élevées de GnRH ont été observées chez les femmes SOPK par rapport aux femmes témoins (2,72 +/- 1,27 ng /mL versus 1,70 +/- 0,03 ; n=8 et n= 15 respectivement, test T de Student, p=0,0045) Figure 5c. Ces nouvelles découvertes confirment l'hypothèse de l'augmentation de l'activité de la GnRH et de sa sécrétion chez les femmes atteintes du SOPK.

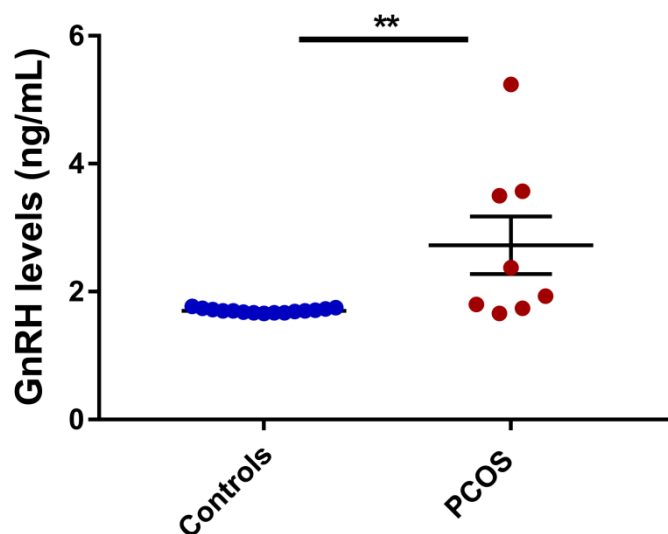


Figure 5c : Analyse comparative des dosages de GnRH entre femmes témoins et SOPK.
 15 et 8 sujets respectivement par groupe. Test T de Student, avec $** p < 0,005$

On retrouve par ailleurs une corrélation positive significative entre les concentrations de GnRH et les taux d'AMH chez ces patientes (corrélation de Pearson, $r=0.65$ $p=0.0007$, $n=23$ au total, figure 5d).

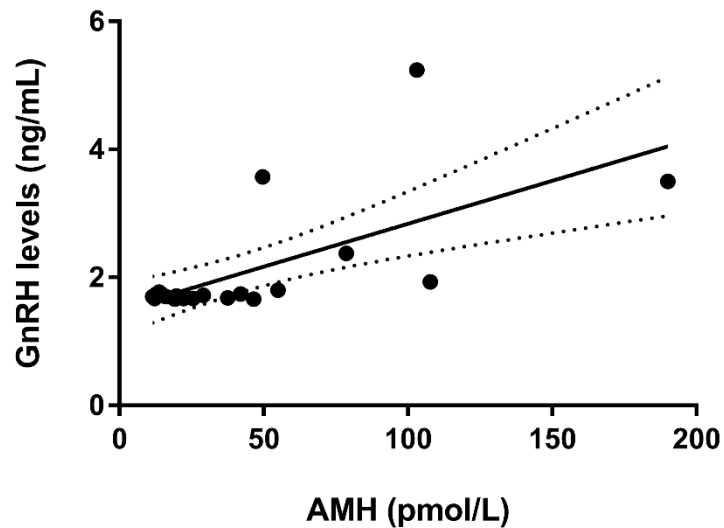


Figure 5d : Corrélation entre la concentration de GnRH et la concentration d'AMH
 (coefficient de corrélation de Spearman, $p < 0,05$)

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ces 20 dernières années, de nombreuses études ont mis en lumière l'implication des cellules gliales dans le contrôle de l'activité neuronale et de la sécrétion de GnRH. (pour revue voir Clasadonte *et al* 2018 [196]). Par ailleurs, il a d'une part été montré que ces interactions étroites entre les cellules gliales et les neurones à GnRH existaient aussi bien chez les singes rhésus [335] que chez l'homme [336] et d'autre part que cette couverture gliale enveloppant les terminaisons des neurones à GnRH était dépendante du bon fonctionnement des boucles de rétrocontrôles stéroïdiennes sur l'hypothalamus [195]. Le rôle tout particulier joué par des cellules épendymogliales spécialisées appelées tanocytes a été démontré en 1985 par Kozlowki et ses collègues [167]. Les tanocytes bordent le troisième ventricule et envoient leurs prolongements vers la zone externe de l'EM, où ils entrent en contact avec des capillaires fenêtrés de l'espace porte pituitaire et modulent ainsi l'accès des terminaisons nerveuses à GnRH à l'espace péri-capillaire [167].

Or, les tanocytes sont dotés d'une plasticité neuro-structurale et cette plasticité morphologique est également dépendante de la production ovarienne de stéroïdes sexuels [193]. Chez les rates, les tanocytes présentent des réarrangements structurels en fonction du stade du cycle œstral. Au cours de la vague pré-ovulatoire de LH, le jour du pro-œstrus, lorsque le taux d'œstradiol augmente, les tanocytes se rétractent, entraînant la libération des axones des neurones à GnRH. Cette rétraction facilite l'établissement d'une relation neuro-hémale directe entre les terminaisons nerveuses à GnRH et les capillaires fenêtrés et, par conséquent, facilite la libération de GnRH dans la circulation porte hypophysaire [172,332]. De manière très intéressante, il a été montré que la suppression sélective de l'intégrine $\beta 1$ dans les tanocytes de souris (cette dernière étant impliquée dans la croissance des prolongements tanocytaires en proœstrus), empêchait la plasticité morphologique des tanocytes, et avait pour conséquence l'apparition de symptômes neuroendocriniens résumant le SOPK (dysovulation, taux élevés de LH) [175]. Ces résultats mettent ainsi en évidence l'implication potentielle des modifications de l'hypothalamus dans la physiopathologie du SOPK.

Finalement, comme il a été démontré que les tanocytes exprimaient le récepteur spécifique à l'AMH (AMHR2) [337] et que l'AMH (dont les taux sont 2 à 3 fois plus élevés chez les femmes atteintes du SOPK) augmentait la sécrétion de la LH en stimulant la sécrétion de GnRH, il était tentant de spéculer que l'AMH pourrait être impliqué dans la plasticité neuro-structurale de l'hypothalamus. Nous avons montré ici pour la première fois que l'AMH pouvait favoriser la rétraction des tanocytes *ex vivo* en fournissant un accès direct des terminaisons à

GnRH à l'espace péri-capillaire et que les mêmes changements morphologiques dans la plasticité de l'éminence médiane étaient observés chez des souris SOPK. Par ailleurs, ces changements morphologiques s'accompagnaient d'une augmentation de la sécrétion de GnRH comme en témoignait le nombre de plus élevé de granules de sécrétion retrouvé chez les souris SOPK par rapport aux souris contrôles. Ensemble ces résultats soulignent l'importance de la plasticité de l'éminence médiane dans le SOPK. La plasticité neuro-structurale de l'hypothalamus n'étant pas évaluable de façon directe chez la femme pour des raisons évidentes, nous avons opté pour une approche indirecte par imagerie afin d'évaluer des différences de plasticité en femmes SOPK et témoins [195]. Nous nous sommes cependant heurtés aux limites techniques de l'approche par imagerie, les régions d'intérêt représentés par l'éminence médiane et le noyau arqué étant proche du 3^{ème} ventricule, des artefacts sont apparus, nous ayant empêché de mesurer de manière fiable le coefficient de diffusion apparent dans ces régions et donc d'évaluer la plasticité hypothalamique chez les femmes SOPK. Cependant, l'approche par imagerie, et plus particulièrement l'utilisation de la spectroscopie par résonance magnétique nous a permis d'observer pour la première fois des différences de concentrations en métabolites cérébraux entre les femmes SOPK et les témoins. Le NAA étant exclusivement sécrété par les neurones, il est considéré comme un marqueur de la viabilité et de l'excitabilité neuronale. Ce marqueur est très utilisé en neuroradiologie dans le diagnostic des tumeurs cérébrales et pour le diagnostic de certaines maladies métaboliques. [338,339]. L'augmentation du NAA dans l'hypothalamus chez les femmes SOPK suggère ainsi une hyperactivité neuronale dans une région particulièrement impliquée dans le contrôle de la sécrétion de GnRH. Il existe néanmoins des limites à notre étude, la principale limite est représentée par la population ayant accepté de participer au protocole d'IRM. En effet, bien que la population ait été sélectionnée sur des critères stricts en termes d'âge et d'IMC (IMC et âge compris entre 18 et 30), afin d'éviter l'introduction de biais, il s'agit d'une population de femmes volontaires ayant consulté pour un désir de contraception (ou un changement de mode de contraception) et non de femmes infertiles. Ceci peut expliquer l'absence de concentrations en LH plus élevées ou d'inversion du ratio FSH/LH chez les patientes incluses dans le protocole (cf résultats tableau 1), l'hypertonie de la LH étant plus fréquente chez les patientes SOPK infertiles en raison d'une dysovulation ou chez les patientes de phénotype A. Au contraire, chez les patientes SOPK infertiles ayant bénéficié d'un bilan hormonal en hôpital de jour, on retrouvait comme classiquement attendu une hypertonie de la LH et une inversion du rapport FSH/LH (cf résultats tableau 2).

Nous apportons donc ici des preuves convaincantes qu'il existe chez les femmes atteintes du SOPK une modification des circuits spécifiques situés dans une région particulière de l'hypothalamus impliquée dans la régulation homéostatique des hormones stéroïdiennes. En effet, l'activité de la GnRH et sa sécrétion dépendent du rétrocontrôle des hormones stéroïdiennes ovariennes. Cependant, bien que les neurones à GnRH expriment l'ER β , ils n'expriment pas l'ER α , ni les récepteurs aux androgènes (AR), ou à la progestérone (PR), ce qui indique que le rétrocontrôle des stéroïdes est indirect et affecte d'autres populations neuronales. De plus, dans différents modèles de souris SOPK, de nombreuses altérations des circuits cérébraux neuronaux spécifiques ont été identifiées dans des populations situées dans le noyau arqué hypothalamique. Ces populations neuronales décrites ci-dessus expriment les AR, PR et ER α renforçant le rôle clé de ces neurones dans la médiation de la rétroaction des stéroïdes.

Les résultats de l'étude par spectroscopie pourraient notamment également expliquer l'hypertonie de la LH observée dans le SOPK. En effet, dans le SOPK, une hypertonie de la LH et un rapport FSH / LH inversé sont retrouvés chez environ 50% des femmes et jusqu'à 95% chez des femmes en bonne santé métabolique [269]. Ces taux circulants plus élevés de LH sont impliqués dans la physiopathologie du SOPK, exacerbant l'hyperandrogénie en stimulant la synthèse d'androgènes par les cellules thécales ovariennes. L'hypertonie de la LH pourrait être attribuée à un défaut du rétrocontrôle inhibiteur de la progestérone [270,301]. Des taux plus élevés de LH ainsi qu'une augmentation de la pulsatilité pourraient suggérer également une stimulation accrue de la fréquence de la pulsatilité de la GnRH [271,272]. Cependant, l'origine de l'hypersecretion de la GnRH chez les femmes atteintes de SOPK reste incertaine. En effet, la sécrétion de ce neuropeptide est épisodique et pulsatile. La GnRH est libérée directement dans la vascularisation porte de l'éminence médiane et sa sécrétion est corrélée à la sécrétion pulsatile de la LH par les cellules hypophysaires [340]. La sécrétion pulsatile de la GnRH diffère selon le stade du cycle menstruel. La sécrétion de GnRH se produit approximativement à une fréquence d'une impulsion par heure pendant la phase folliculaire et à une fréquence d'une impulsion toutes les 2 à 3 heures durant la phase lutéale chez les mammifères [341]. En outre, la demi-vie de la GnRH dans le sérum étant très courte, environ 2 à 4 minutes [342], ainsi son dosage ne peut pas être réalisé en routine dans le sang périphérique. Ici, grâce à l'utilisation d'une méthode de dosage sensible et spécifique (contrairement aux dosages de type Elisa), nous avons pour la première fois mis en évidence

que les femmes atteintes de SOPK présentaient des concentrations sériques plus élevées de GnRH. Cette augmentation de la libération de GnRH pourrait résulter de deux mécanismes complémentaires. Le premier mécanisme est la stimulation du générateur de pulses de GnRH par différents réseaux neuronaux extrinsèques aux neurones à GnRH. En effet, des études récentes chez la souris ont démontré que des sous-populations de neurones situés dans le noyau arqué activent les neurones à GnRH [341]. Ces neurones comprennent les neurones GABAergiques et les neurones KNDy [325].

La kisspeptine est connue pour sa capacité à stimuler la sécrétion de GnRH / LH [343,344]. Plusieurs études ont fait état de concentrations en kisspeptine plus élevées chez les femmes atteintes de SOPK [293,294,345,346]. Cependant, des résultats contradictoires chez les modèles animaux de SOPK concernant une éventuelle augmentation du nombre de neurones à kisspeptine dans le noyau arqué ont finalement mis en doute le rôle de la kisspeptine dans la physiopathologie du SOPK [297,301], confinant la kisspeptine à un rôle mineur dans les changements observés dans la sécrétion de la GnRH dans le cadre du SOPK [297]. Ici, nos résultats vont dans ce sens, nous avons mis en évidence que l'augmentation de l'activité neuronale observée dans l'ARH des animaux SOPK n'était probablement pas le fait des neurones à kisspeptine. Il n'est pas contre pas possible d'éliminer définitivement l'implication des neurones à kisspeptine sur les résultats d'une seule expérience d'immunohistochimie. Les résultats obtenus peuvent être également liés au modèle animal SOPK utilisé ici (PAMH) qui diffère du modèle plus couramment utilisé dans la littérature (PNA). Afin de conclure, des expériences d'électrophysiologie sont nécessaires ou l'utilisation d'un antagoniste dirigé contre la kisspeptine. Une autre population neuronale située dans le noyau arqué semble donc impliquée. Notre hypothèse est qu'il pourrait s'agir de neurones GABAergiques. En effet, autrefois considérés comme des neurones inhibiteurs, on considère maintenant que les neurones GABAergiques exercent un effet principalement excitateur sur les neurones à GnRH [84,198]. L'effet du GABA sur la modulation de la libération de la GnRH semble être dépendant de l'œstradiol [347–349]. Dans les modèles animaux de SOPK, il a été démontré que les neurones GABAergiques augmentaient la transmission aux neurones GnRH [148], augmentaient l'innervation dirigée vers les neurones GnRH [197]. De plus, dans les modèles animaux SOPK (de type PNA), des anomalies des circuits GABAergiques dans le noyau arqué ont été décelées en période prépubertaire avant que n'apparaissent les symptômes du SOPK [86,306]. Par ailleurs, une étude récente a notamment démontré que les femmes atteintes de SOPK

présentaient des concentrations plus élevées de GABA et d'œstradiol dans leur liquide céphalo-rachidien que les femmes témoins ovulantes [300]. Globalement, ces données ont mis en lumière le rôle clé joué par les populations neuronales du noyau arqué dans la physiopathologie du SOPK. Afin de confirmer cette hypothèse, nous projetons d'effectuer une analyse comparative quantifiant le nombre de neurones coexprimant le GABA et le c-FOS par hybridation *in-situ* fluorescente (RNAscope). Par ailleurs, nous avons dans notre étude clinique comparant les métabolites cérébraux entre femmes SOPK et témoins ajouter la mesure du GABA et du glutamate à l'aide d'un voxel spécifique. Cependant, ces analyses n'ont pu être possible que sur un petit nombre de sujets (11 au total, 6 témoins et 5 femmes SOPK respectivement), ne permettant pas de conclure actuellement.

En conclusion, autrefois considérée comme une pathologie exclusivement gonadique, de plus en plus d'éléments suggèrent l'implication d'un dysfonctionnement neuroendocrinien dans la physiopathologie du SOPK [198,270,282,325,327]. Ensemble, nos résultats révèlent le rôle jusqu'ici inconnu de la plasticité neurostructurale de l'hypothalamus avec, au premier plan, les cellules épendymogliales spécialisées appelées tanocytes dans la physiopathologie du SOPK. Pour la première fois, nous avons démontré que ces changements neurostructuraux étaient associés à une activité neuronale accrue entraînant une augmentation de la sécrétion de GnRH chez les femmes atteintes de SOPK. Ces informations importantes mettent en évidence le rôle clé du cerveau dans l'origine du SOPK.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Campbell RE, Gaidamaka G, Han S-K, Herbison AE. Dendro-dendritic bundling and shared synapses between gonadotropin-releasing hormone neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun;106(26):10835–40.
- 2 Wildt L, Häusler A, Marshall G, Hutchison JS, Plant TM, Belchetz PE, et al. Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*. 1981 Aug;109(2):376–85.
- 3 Reame N, Sauder SE, Kelch RP, Marshall JC. Pulsatile gonadotropin secretion during the human menstrual cycle: evidence for altered frequency of gonadotropin-releasing hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984 Aug;59(2):328–37.
- 4 Marshall JC, Kelch RP. Gonadotropin-releasing hormone: role of pulsatile secretion in the regulation of reproduction. *N Engl J Med*. 1986 Dec;315(23):1459–68.
- 5 Moenter SM, Caraty A, Locatelli A, Karsch FJ. Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology*. 1991 Sep;129(3):1175–82.
- 6 Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophthalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*. 1978 Nov;202(4368):631–3.
- 7 Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Paul SJ, Ortolano GA, Kelch RP. Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res*. 1991;47:155–87; discussion 188-189.
- 8 Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, et al. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science*. 1971 Sep;173(4001):1036–8.
- 9 Christian CA, Moenter SM. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev*. 2010 Aug;31(4):544–77.
- 10 Carmel PW, Araki S, Ferin M. Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys: evidence for pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *Endocrinology*. 1976 Jul;99(1):243–8.
- 11 Antunes JL, Carmel PW, Housepian EM, Ferin M. Luteinizing hormone-releasing hormone in human pituitary blood. *J Neurosurg*. 1978 Sep;49(3):382–6.
- 12 Maeda K-I, Ohkura S, Uenoyama Y, Wakabayashi Y, Oka Y, Tsukamura H, et al. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res*. 2010 Dec;1364:103–15.
- 13 Moenter SM, Defazio RA, Straume M, Nunemaker CS. Steroid regulation of GnRH neurons. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Dec;1007:143–52.

- 14 Schwanzel-Fukuda M, Crossin KL, Pfaff DW, Bouloux PM, Hardelin JP, Petit C. Migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in early human embryos. *J Comp Neurol.* 1996 Mar;366(3):547–57.
- 15 Casoni F, Malone SA, Belle M, Luzzati F, Collier F, Allet C, et al. Development of the neurons controlling fertility in humans: new insights from 3D imaging and transparent fetal brains. *Dev Camb Engl.* 2016 Nov;143(21):3969–81.
- 16 Giacobini P. Shaping the Reproductive System: Role of Semaphorins in Gonadotropin-Releasing Hormone Development and Function. *Neuroendocrinology.* 2015;102(3):200–15.
- 17 Malone SA, Papadakis GE, Messina A, Mimouni NEH, Trova S, Imbernon M, et al. Defective AMH signaling disrupts GnRH neuron development and function and contributes to hypogonadotropic hypogonadism. *eLife.* 2019 Jul;8. DOI: 10.7554/eLife.47198
- 18 Gault PM, Maudsley S, Lincoln GA. Evidence that gonadotropin-releasing hormone II is not a physiological regulator of gonadotropin secretion in mammals. *J Neuroendocrinol.* 2003 Sep;15(9):831–9.
- 19 Herde MK, Geist K, Campbell RE, Herbison AE. Gonadotropin-releasing hormone neurons extend complex highly branched dendritic trees outside the blood-brain barrier. *Endocrinology.* 2011 Oct;152(10):3832–41.
- 20 Herde MK, Iremonger KJ, Constantin S, Herbison AE. GnRH neurons elaborate a long-range projection with shared axonal and dendritic functions. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2013 Jul;33(31):12689–97.
- 21 Campbell RE, Han S-K, Herbison AE. Biocytin filling of adult gonadotropin-releasing hormone neurons in situ reveals extensive, spiny, dendritic processes. *Endocrinology.* 2005 Mar;146(3):1163–9.
- 22 Ojeda SR, Roth C, Mungenast A, Heger S, Mastronardi C, Parent A-S, et al. Neuroendocrine mechanisms controlling female puberty: new approaches, new concepts. *Int J Androl.* 2006 Feb;29(1):256–63; discussion 286-290.
- 23 Simpson ER. Aromatization of androgens in women: current concepts and findings. *Fertil Steril.* 2002 Apr;77 Suppl 4:S6-10.
- 24 Matthews J, Gustafsson J-A. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv.* 2003 Aug;3(5):281–92.
- 25 Krege JH, Hodgins JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec;95(26):15677–82.
- 26 Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Dev Camb Engl.* 2000 Oct;127(19):4277–91.

- 27 Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec;90(23):11162–6.
- 28 Couse JF, Korach KS. Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Ann Endocrinol*. 1999 Jul;60(2):143–8.
- 29 Hewitt SC, Korach KS. Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reprod Camb Engl*. 2003 Feb;125(2):143–9.
- 30 Herbison AE. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev*. 1998 Jun;19(3):302–30.
- 31 Levine JE. New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in rats. *Biol Reprod*. 1997 Feb;56(2):293–302.
- 32 Pau KY, Berria M, Hess DL, Spies HG. Preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in ovarian-intact rhesus macaques. *Endocrinology*. 1993 Oct;133(4):1650–6.
- 33 Hrabovszky E, Kalló I, Szlávik N, Keller E, Merchenthaler I, Liposits Z. Gonadotropin-releasing hormone neurons express estrogen receptor-beta. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jul;92(7):2827–30.
- 34 Simonian SX, Herbison AE. Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression during GnRH neuron migration in the mouse. *Neuroendocrinology*. 2001 Mar;73(3):149–56.
- 35 Skinner DC, Caraty A, Allingham R. Unmasking the progesterone receptor in the preoptic area and hypothalamus of the ewe: no colocalization with gonadotropin-releasing neurons. *Endocrinology*. 2001 Feb;142(2):573–9.
- 36 Herbison AE, Skinner DC, Robinson JE, King IS. Androgen receptor-immunoreactive cells in ram hypothalamus: distribution and co-localization patterns with gonadotropin-releasing hormone, somatostatin and tyrosine hydroxylase. *Neuroendocrinology*. 1996 Feb;63(2):120–31.
- 37 Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, Gröne H-J, Todman MG, et al. Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron*. 2006 Oct;52(2):271–80.
- 38 Goodman RL, Holaskova I, Nestor CC, Connors JM, Billings HJ, Valent M, et al. Evidence that the arcuate nucleus is an important site of progesterone negative feedback in the ewe. *Endocrinology*. 2011 Sep;152(9):3451–60.
- 39 He W, Li X, Adekunbi D, Liu Y, Long H, Wang L, et al. Hypothalamic effects of progesterone on regulation of the pulsatile and surge release of luteinising hormone in female rats. *Sci Rep*. 2017 14;7(1):8096.
- 40 Biran J, Tahor M, Wircer E, Levkowitz G. Role of developmental factors in hypothalamic function. *Front Neuroanat*. 2015;9:47.

- 41 Sullivan SD, Moenter SM. GABAergic integration of progesterone and androgen feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Biol Reprod.* 2005 Jan;72(1):33–41.
- 42 Yeo S-H, Clarkson J, Herbison AE. Kisspeptin-gpr54 signaling at the GnRH neuron is necessary for negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion in female mice. *Neuroendocrinology.* 2014;100(2–3):191–7.
- 43 Dubois SL, Acosta-Martínez M, DeJoseph MR, Wolfe A, Radovick S, Boehm U, et al. Positive, but not negative feedback actions of estradiol in adult female mice require estrogen receptor α in kisspeptin neurons. *Endocrinology.* 2015 Mar;156(3):1111–20.
- 44 Goldsmith PC, Boggan JE, Thind KK. Estrogen and progesterone receptor expression in neuroendocrine and related neurons of the pubertal female monkey hypothalamus. *Neuroendocrinology.* 1997 May;65(5):325–34.
- 45 Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology.* 2005 Sep;146(9):3686–92.
- 46 Walters KA, Gilchrist RB, Ledger WL, Teede HJ, Handelsman DJ, Campbell RE. New Perspectives on the Pathogenesis of PCOS: Neuroendocrine Origins. *Trends Endocrinol Metab TEM.* 2018 Dec;29(12):841–52.
- 47 de Roux N, Genin E, Carel J-C, Matsuda F, Chaussain J-L, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep;100(19):10972–6.
- 48 Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med.* 2003 Oct;349(17):1614–27.
- 49 Kauffman AS. Coming of age in the kisspeptin era: sex differences, development, and puberty. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Aug;324(1–2):51–63.
- 50 Han S-K, 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 Off J Soc Neurosci.* 2005 Dec;25(49):11349–56.
- 51 Herbison AE, de Tassigny X d'Anglemont, Doran J, Colledge WH. Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology.* 2010 Jan;151(1):312–21.
- 52 Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz MB, Erdogan S, et al. Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med.* 2012 Feb;366(7):629–35.
- 53 Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Dec;312(4):1357–63.

- 54 Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*. 2004 Sep;145(9):4073–7.
- 55 Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Tovar S, Roa J, Mayen A, et al. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology*. 2005 Apr;146(4):1689–97.
- 56 Caraty A, Smith JT, Lomet D, Ben Saïd S, Morrissey A, Cognie J, et al. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology*. 2007 Nov;148(11):5258–67.
- 57 Smith JT. Kisspeptin signalling in the brain: steroid regulation in the rodent and ewe. *Brain Res Rev*. 2008 Mar;57(2):288–98.
- 58 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 Feb;102(5):1761–6.
- 59 Newton CL, Anderson RC, Millar RP. Therapeutic Neuroendocrine Agonist and Antagonist Analogs of Hypothalamic Neuropeptides as Modulators of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis. *Endocr Dev*. 2016;30:106–29.
- 60 Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 2006 Dec;147(12):5817–25.
- 61 Clarkson J, d'Anglemon de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol*. 2009 Aug;21(8):673–82.
- 62 Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, Horvath MC, Keller E, Caraty A, et al. The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur J Neurosci*. 2010 Jun;31(11):1984–98.
- 63 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 Off J Soc Neurosci*. 2006 Jun;26(25):6687–94.
- 64 Radovick S, Levine JE, Wolfe A. Estrogenic regulation of the GnRH neuron. *Front Endocrinol*. 2012;3:52.
- 65 Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 Jul;254–255:91–6.
- 66 Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev*. 2009 Oct;30(6):713–43.

- 67 Maeda K-I, Adachi S, Inoue K, Ohkura S, Tsukamura H. Metastin/kisspeptin and control of estrous cycle in rats. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007 Mar;8(1):21–9.
- 68 Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, et al. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology*. 2005 Oct;146(10):4431–6.
- 69 Gu GB, Simerly RB. Projections of the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus in the female rat. *J Comp Neurol*. 1997 Jul;384(1):142–64.
- 70 Clarkson J, Han SY, Piet R, McLennan T, Kane GM, Ng J, et al. Definition of the hypothalamic GnRH pulse generator in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 21;114(47):E10216–23.
- 71 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*. 2010 Aug;151(8):3479–89.
- 72 Kew JNC, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005 Apr;179(1):4–29.
- 73 Spergel DJ, Krüth U, Hanley DF, Sprengel R, Seeburg PH. GABA- and glutamate-activated channels in green fluorescent protein-tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1999 Mar;19(6):2037–50.
- 74 Maffucci JA, Gore AC. Chapter 2: hypothalamic neural systems controlling the female reproductive life cycle gonadotropin-releasing hormone, glutamate, and GABA. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2009;274:69–127.
- 75 Cheong RY, Czielesky K, Porteous R, Herbison AE. Expression of ESR1 in Glutamatergic and GABAergic Neurons Is Essential for Normal Puberty Onset, Estrogen Feedback, and Fertility in Female Mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2015 Oct;35(43):14533–43.
- 76 Gore AC, Oung T, Woller MJ. Age-related changes in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone and N-methyl-D-aspartate receptor gene expression, and their regulation by oestrogen, in the female rat. *J Neuroendocrinol*. 2002 Apr;14(4):300–9.
- 77 Jennes L, Lin W, Lakhani S. Glutamatergic regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Prog Brain Res*. 2002;141:183–92.
- 78 Ottem EN, Godwin JG, Petersen SL. Glutamatergic signaling through the N-methyl-D-aspartate receptor directly activates medial subpopulations of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons, but does not appear to mediate the effects of estradiol on LHRH gene expression. *Endocrinology*. 2002 Dec;143(12):4837–45.
- 79 Gore AC, Wu TJ, Rosenberg JJ, Roberts JL. Gonadotropin-releasing hormone and NMDA receptor gene expression and colocalization change during puberty in female rats. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1996 Sep;16(17):5281–9.

- 80 Bourguignon JP, Gerard A, Alvarez Gonzalez ML, Purnelle G, Franchimont P. Endogenous glutamate involvement in pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone: evidence from effect of glutamine and developmental changes. *Endocrinology*. 1995 Mar;136(3):911–6.
- 81 Gu G, Varoqueaux F, Simerly RB. Hormonal regulation of glutamate receptor gene expression in the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1999 Apr;19(8):3213–22.
- 82 Mahesh VB, Brann DW. Regulatory role of excitatory amino acids in reproduction. *Endocrine*. 2005 Dec;28(3):271–80.
- 83 DeFazio RA, Heger S, Ojeda SR, Moenter SM. Activation of A-type gamma-aminobutyric acid receptors excites gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 2002 Dec;16(12):2872–91.
- 84 Herbison AE, Moenter SM. Depolarising and hyperpolarising actions of GABA(A) receptor activation on gonadotrophin-releasing hormone neurones: towards an emerging consensus. *J Neuroendocrinol*. 2011 Jul;23(7):557–69.
- 85 Moore AM, Campbell RE. The neuroendocrine genesis of polycystic ovary syndrome: A role for arcuate nucleus GABA neurons. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016 Jun;160:106–17.
- 86 Silva MSB, Desroziers E, Hessler S, Prescott M, Coyle C, Herbison AE, et al. Activation of arcuate nucleus GABA neurons promotes luteinizing hormone secretion and reproductive dysfunction: Implications for polycystic ovary syndrome. *EBioMedicine*. 2019 Jun;44:582–96.
- 87 Förstermann U, Pollock JS, Tracey WR, Nakane M. Isoforms of nitric-oxide synthase: purification and regulation. *Methods Enzymol*. 1994;233:258–64.
- 88 Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Sep;88(17):7797–801.
- 89 Yamada K, Emson P, Hökfelt T. Immunohistochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat hypothalamus and colocalization with neuropeptides. *J Chem Neuroanat*. 1996 Jun;10(3–4):295–316.
- 90 Herbison AE, Simonian SX, Norris PJ, Emson PC. Relationship of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity to GnRH neurons in the ovariectomized and intact female rat. *J Neuroendocrinol*. 1996 Jan;8(1):73–82.
- 91 Clasadonte J, Poulain P, Beauvillain J-C, Prevot V. Activation of neuronal nitric oxide release inhibits spontaneous firing in adult gonadotropin-releasing hormone neurons: a possible local synchronizing signal. *Endocrinology*. 2008 Feb;149(2):587–96.
- 92 Prevot V, Bouret S, Stefano GB, Beauvillain J. Median eminence nitric oxide signaling. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000 Nov;34(1–2):27–41.

- 93 Rettori V, Belova N, Dees WL, Nyberg CL, Gimeno M, McCann SM. Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Nov;90(21):10130–4.
- 94 Bonavera JJ, Sahu A, Kalra PS, Kalra SP. Evidence in support of nitric oxide (NO) involvement in the cyclic release of prolactin and LH surges. *Brain Res*. 1994 Oct;660(1):175–9.
- 95 d'Anglemont de Tassigny X, Campagne C, Steculorum S, Prevot V. Estradiol induces physical association of neuronal nitric oxide synthase with NMDA receptor and promotes nitric oxide formation via estrogen receptor activation in primary neuronal cultures. *J Neurochem*. 2009 Apr;109(1):214–24.
- 96 Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, et al. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell*. 1986 Jun;45(5):685–98.
- 97 Jost A. [Not Available]. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1947 Feb;141(3–4):135.
- 98 Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, et al. The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Hum Reprod Update*. 2014 Jun;20(3):370–85.
- 99 Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen APN, Hovatta O. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2006 Sep;21(9):2223–7.
- 100 La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Arsenio AC, et al. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update*. 2010 Apr;16(2):113–30.
- 101 Picard JY, Benarous R, Guerrier D, Josso N, Kahn A. Cloning and expression of cDNA for anti-müllerian hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Aug;83(15):5464–8.
- 102 Münsterberg A, Lovell-Badge R. Expression of the mouse anti-müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Dev Camb Engl*. 1991 Oct;113(2):613–24.
- 103 Haqq C, Lee MM, Tizard R, Wysk M, DeMarinis J, Donahoe PK, et al. Isolation of the rat gene for Müllerian inhibiting substance. *Genomics*. 1992 Apr;12(4):665–9.
- 104 Lahbib-Mansais Y, Barbosa A, Yerle M, Parma P, Milan D, Pailhoux E, et al. Mapping in pig of genes involved in sexual differentiation: AMH, WT1, FTZF1, SOX2, SOX9, AHC, and placental and embryonic CYP19. *Cytogenet Cell Genet*. 1997;76(1–2):109–14.
- 105 Oreal E, Pieau C, Mattei MG, Josso N, Picard JY, Carré-Eusèbe D, et al. Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. 1998 Aug;212(4):522–32.

- 106 Western PS, Harry JL, Graves JA, Sinclair AH. Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* 1999 Dec;216(4-5):411-9.
- 107 Pask AJ, Whitworth DJ, Mao C-A, Wei K-J, Sankovic N, Graves JAM, et al. Marsupial anti-Mullerian hormone gene structure, regulatory elements, and expression. *Biol Reprod.* 2004 Jan;70(1):160-7.
- 108 Schulz RW, Bogerd J, Male R, Ball J, Fenske M, Olsen LC, et al. Estrogen-induced alterations in *amh* and *dmrt1* expression signal for disruption in male sexual development in the zebrafish. *Environ Sci Technol.* 2007 Sep;41(17):6305-10.
- 109 Al-Asaad I, Chardard D, di Clemente N, Picard J-Y, Dumond H, Chesnel A, et al. Müllerian inhibiting substance in the caudate amphibian *Pleurodeles waltl*. *Endocrinology.* 2013 Oct;154(10):3931-6.
- 110 di Clemente N, Ghaffari S, Pepinsky RB, Pieau C, Josso N, Cate RL, et al. A quantitative and interspecific test for biological activity of anti-müllerian hormone: the fetal ovary aromatase assay. *Dev Camb Engl.* 1992 Mar;114(3):721-7.
- 111 di Clemente N, Jamin SP, Lugovskoy A, Carmillo P, Ehrenfels C, Picard J-Y, et al. Processing of anti-mullerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF-beta. *Mol Endocrinol Baltim Md.* 2010 Nov;24(11):2193-206.
- 112 Pankhurst MW, McLennan IS. Human blood contains both the uncleaved precursor of anti-Mullerian hormone and a complex of the NH₂- and COOH-terminal peptides. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013 Nov;305(10):E1241-1247.
- 113 MacLaughlin DT, Hudson PL, Graciano AL, Kenneally MK, Ragin RC, Manganaro TF, et al. Mullerian duct regression and antiproliferative bioactivities of mullerian inhibiting substance reside in its carboxy-terminal domain. *Endocrinology.* 1992 Jul;131(1):291-6.
- 114 McLennan IS, Pankhurst MW. Anti-Müllerian hormone is a gonadal cytokine with two circulating forms and cryptic actions. *J Endocrinol.* 2015 Sep;226(3):R45-57.
- 115 Wilson CA, di Clemente N, Ehrenfels C, Pepinsky RB, Josso N, Vigier B, et al. Mullerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Endocrinol Baltim Md.* 1993 Feb;7(2):247-57.
- 116 Nachtigal MW, Ingraham HA. Bioactivation of Müllerian inhibiting substance during gonadal development by a *kex2*/subtilisin-like endoprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jul;93(15):7711-6.
- 117 Cain BM, Connolly K, Blum A, Vishnuvardhan D, Marchand JE, Beinfeld MC, et al. Distribution and colocalization of cholecystokinin with the prohormone convertase enzymes PC1, PC2, and PC5 in rat brain. *J Comp Neurol.* 2003 Dec;467(3):307-25.

- 118 Villeneuve P, Seidah NG, Beaudet A. Immunohistochemical evidence for the implication of PC1 in the processing of proneurotensin in rat brain. *Neuroreport*. 2000 Nov;11(16):3443–7.
- 119 Winsky-Sommerer R, Benjannet S, Rovère C, Barbero P, Seidah NG, Epelbaum J, et al. Regional and cellular localization of the neuroendocrine prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*. 2000 Aug;424(3):439–60.
- 120 Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen AP, et al. Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology*. 1995 Nov;136(11):4951–62.
- 121 Mishina Y, Rey R, Finegold MJ, Matzuk MM, Josso N, Cate RL, et al. Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes Dev*. 1996 Oct;10(20):2577–87.
- 122 Dewailly D, Gronier H, Poncelet E, Robin G, Leroy M, Pigny P, et al. Diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2011 Nov;26(11):3123–9.
- 123 van Rooij I a. J, Broekmans FJM, te Velde ER, Fauser BCJM, Bancsi LFJMM, de Jong FH, et al. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2002 Dec;17(12):3065–71.
- 124 Devillers M, Petit F, Cluzet V, François CM, Giton F, Garrel G, et al. FSH inhibits AMH to support ovarian estradiol synthesis in infantile mice. *J Endocrinol*. 2018 Nov DOI: 10.1530/JOE-18-0313
- 125 Torres-Rovira L, Succu S, Pasciu V, Manca ME, Gonzalez-Bulnes A, Leoni GG, et al. Postnatal pituitary and follicular activation: a revisited hypothesis in a sheep model. *Reprod Camb Engl*. 2016 Mar;151(3):215–25.
- 126 van Houten EL a. F, Themmen APN, Visser JA. Anti-Müllerian hormone (AMH): regulator and marker of ovarian function. *Ann Endocrinol*. 2010 May;71(3):191–7.
- 127 Segev DL, Hoshiya Y, Stephen AE, Hoshiya M, Tran TT, MacLaughlin DT, et al. Mullerian inhibiting substance regulates NFkappaB signaling and growth of mammary epithelial cells in vivo. *J Biol Chem*. 2001 Jul;276(29):26799–806.
- 128 Segev DL, Hoshiya Y, Hoshiya M, Tran TT, Carey JL, Stephen AE, et al. Mullerian-inhibiting substance regulates NF-kappa B signaling in the prostate in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jan;99(1):239–44.
- 129 Hoshiya Y, Gupta V, Segev DL, Hoshiya M, Carey JL, Sasur LM, et al. Mullerian Inhibiting Substance induces NFkB signaling in breast and prostate cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2003 Dec;211(1–2):43–9.

- 130 Catlin EA, Tonnu VC, Ebb RG, Pacheco BA, Manganaro TF, Ezzell RM, et al. Müllerian inhibiting substance inhibits branching morphogenesis and induces apoptosis in fetal rat lung. *Endocrinology*. 1997 Feb;138(2):790–6.
- 131 Wang P-Y, Koishi K, McGeachie AB, Kimber M, Maclaughlin DT, Donahoe PK, et al. Mullerian inhibiting substance acts as a motor neuron survival factor in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov;102(45):16421–5.
- 132 Wang P-Y, Protheroe A, Clarkson AN, Imhoff F, Koishi K, McLennan IS. Müllerian inhibiting substance contributes to sex-linked biases in the brain and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr;106(17):7203–8.
- 133 Lebeurrier N, Launay S, Macrez R, Maubert E, Legros H, Leclerc A, et al. Anti-Mullerian-hormone-dependent regulation of the brain serine-protease inhibitor neuroserpin. *J Cell Sci*. 2008 Oct;121(Pt 20):3357–65.
- 134 Cimino I, Casoni F, Liu X, Messina A, Parkash J, Jamin SP, et al. Novel role for anti-Müllerian hormone in the regulation of GnRH neuron excitability and hormone secretion. *Nat Commun*. 2016 Jan;7:10055.
- 135 Garrel G, Racine C, L'Hôte D, Denoyelle C, Guigon CJ, di Clemente N, et al. Anti-Müllerian hormone: a new actor of sexual dimorphism in pituitary gonadotrope activity before puberty. *Sci Rep*. 2016 Mar;6:23790.
- 136 Stadler C, Rexhepaj E, Singan VR, Murphy RF, Pepperkok R, Uhlén M, et al. Immunofluorescence and fluorescent-protein tagging show high correlation for protein localization in mammalian cells. *Nat Methods*. 2013 Apr;10(4):315–23.
- 137 Araque A, Carmignoto G, Haydon PG. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:795–813.
- 138 Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Aug;6(8):626–40.
- 139 Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, et al. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci*. 2007 Mar;10(3):331–9.
- 140 Perea G, Araque A. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*. 2007 Aug;317(5841):1083–6.
- 141 Wigley R, Hamilton N, Nishiyama A, Kirchhoff F, Butt AM. Morphological and physiological interactions of NG2-glia with astrocytes and neurons. *J Anat*. 2007 Jun;210(6):661–70.
- 142 Garcia-Segura LM, Luquín S, Párducz A, Naftolin F. Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus. *Glia*. 1994 Jan;10(1):59–69.

- 143 Hatton GI. Function-related plasticity in hypothalamus. *Annu Rev Neurosci.* 1997;20:375–97.
- 144 Theodosis DT, Trailin A, Poulain DA. Remodeling of astrocytes, a prerequisite for synapse turnover in the adult brain? Insights from the oxytocin system of the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006 May;290(5):R1175-1182.
- 145 Garcia-Segura LM, Melcangi RC. Steroids and glial cell function. *Glia.* 2006 Nov;54(6):485–98.
- 146 Connolly PB, Resko JA. Prenatal testosterone differentiates brain regions controlling gonadotropin release in guinea pigs. *Biol Reprod.* 1994 Jul;51(1):125–30.
- 147 Foecking EM, Szabo M, Schwartz NB, Levine JE. Neuroendocrine consequences of prenatal androgen exposure in the female rat: absence of luteinizing hormone surges, suppression of progesterone receptor gene expression, and acceleration of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator. *Biol Reprod.* 2005 Jun;72(6):1475–83.
- 148 Sullivan SD, Moenter SM. Prenatal androgens alter GABAergic drive to gonadotropin-releasing hormone neurons: implications for a common fertility disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May;101(18):7129–34.
- 149 Elsaesser F, Parvizi N. Estrogen feedback in the pig: sexual differentiation and the effect of prenatal testosterone treatment. *Biol Reprod.* 1979 Jun;20(5):1187–93.
- 150 Fabre-Nys C, Venier G. Sexual differentiation of sexual behaviour and preovulatory LH surge in ewes. *Psychoneuroendocrinology.* 1991;16(5):383–96.
- 151 Herbosa CG, Dahl GE, Evans NP, Pelt J, Wood RI, Foster DL. Sexual differentiation of the surge mode of gonadotropin secretion: prenatal androgens abolish the gonadotropin-releasing hormone surge in the sheep. *J Neuroendocrinol.* 1996 Aug;8(8):627–33.
- 152 Kim SJ, Foster DL, Wood RI. Prenatal testosterone masculinizes synaptic input to gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Biol Reprod.* 1999 Sep;61(3):599–605.
- 153 Dumesic DA, Abbott DH, Eisner JR, Goy RW. Prenatal exposure of female rhesus monkeys to testosterone propionate increases serum luteinizing hormone levels in adulthood. *Fertil Steril.* 1997 Jan;67(1):155–63.
- 154 Chen S-C, Hsieh J-T, Yu H-J, Chang H-C. Appropriate cut-off value for follicle-stimulating hormone in azoospermia to predict spermatogenesis. *Reprod Biol Endocrinol RBE.* 2010;8:108.
- 155 Sharma TP, Herkimer C, West C, Ye W, Birch R, Robinson JE, et al. Fetal programming: prenatal androgen disrupts positive feedback actions of estradiol but does not affect timing of puberty in female sheep. *Biol Reprod.* 2002 Apr;66(4):924–33.
- 156 Birch RA, Padmanabhan V, Foster DL, Unsworth WP, Robinson JE. Prenatal programming of reproductive neuroendocrine function: fetal androgen exposure produces

- progressive disruption of reproductive cycles in sheep. *Endocrinology*. 2003 Apr;144(4):1426–34.
- 157 Perera AD, Plant TM. Ultrastructural studies of neuronal correlates of the pubertal reaugmentation of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Comp Neurol*. 1997 Aug;385(1):71–82.
- 158 Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández 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*. 2004 Oct;145(10):4565–74.
- 159 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 Feb;102(6):2129–34.
- 160 Cottrell EC, Campbell RE, Han S-K, Herbison AE. Postnatal remodeling of dendritic structure and spine density in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 2006 Aug;147(8):3652–61.
- 161 Ramón y Cajal, . *Névrologie*. In: Maloine. *Histologie du système nerveux de l’homme et des vertébrés*. Paris, France: Maloine; 1909; pp 230–52.
- 162 Prevot V, Dehouck B, Sharif A, Ciofi P, Giacobini P, Clasadonte J. The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. *Endocr Rev*. 2018 01;39(3):333–68.
- 163 Barry J, Cotte G. [Preliminary study with electron microscopy on the median eminence in the guinea pig]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat Vienna Austria* 1948. 1961;53:714–24.
- 164 Rodríguez EM. Ependymal specializations. I. Fine structure of the neural (internal) region of the toad median eminence, with particular reference to the connections between the ependymal cells and the subependymal capillary loops. *Z Zellforsch Mikrosk Anat Vienna Austria* 1948. 1969;102(2):153–71.
- 165 Calas A, Assenmacher I. [Ultrastructure of the median eminence of the duck *Anas platyrhynchos*]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat Vienna Austria* 1948. 1970;109(1):64–82.
- 166 Beauvillain JC. [Fine structure of the mouse median eminence during early stages of its ontogenesis]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat Vienna Austria* 1948. 1973 May;139(2):201–15.
- 167 Kozłowski GP, Coates PW. Ependymoneuronal specializations between LHRH fibers and cells of the cerebroventricular system. *Cell Tissue Res*. 1985;242(2):301–11.
- 168 Ugrumov MV, Ivanova IP, Mitskevich MS, Liposits Z, Sétáló G, Flerkó B. Axovascular relationships in developing median eminence of perinatal rats with special reference to luteinizing hormone-releasing hormone projections. *Neuroscience*. 1985 Dec;16(4):897–906.

- 169 Ugrumov M, Hisano S, Daikoku S. Topographic relations between tyrosine hydroxylase- and luteinizing hormone-releasing hormone-immunoreactive fibers in the median eminence of adult rats. *Neurosci Lett*. 1989 Jul;102(2-3):159-64.
- 170 Silverman RC, Gibson MJ, Silverman AJ. Relationship of glia to GnRH axonal outgrowth from third ventricular grafts in hpg hosts. *Exp Neurol*. 1991 Dec;114(3):259-74.
- 171 King JC, Letourneau RJ. Luteinizing hormone-releasing hormone terminals in the median eminence of rats undergo dramatic changes after gonadectomy, as revealed by electron microscopic image analysis. *Endocrinology*. 1994 Mar;134(3):1340-51.
- 172 Prevot V, Croix D, Bouret S, Dutoit S, Tramu G, Stefano GB, et al. Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neuroscience*. 1999;94(3):809-19.
- 173 Prevot V, Bellefontaine N, Baroncini M, Sharif A, Hanchate NK, Parkash J, et al. Gonadotrophin-releasing hormone nerve terminals, tanycytes and neurohaemal junction remodelling in the adult median eminence: functional consequences for reproduction and dynamic role of vascular endothelial cells. *J Neuroendocrinol*. 2010 Jul;22(7):639-49.
- 174 Cashion AB, Smith MJ, Wise PM. The morphometry of astrocytes in the rostral preoptic area exhibits a diurnal rhythm on proestrus: relationship to the luteinizing hormone surge and effects of age. *Endocrinology*. 2003 Jan;144(1):274-80.
- 175 Parkash J, Messina A, Langlet F, Cimino I, Loyens A, Mazur D, et al. Semaphorin7A regulates neuroglial plasticity in the adult hypothalamic median eminence. *Nat Commun*. 2015;6:6385.
- 176 Garcia-Ovejero D, Azcoitia I, DonCarlos LL, Melcangi RC, Garcia-Segura LM. Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005 Apr;48(2):273-86.
- 177 Langub MC, Watson RE. Estrogen receptor-immunoreactive glia, endothelia, and ependyma in guinea pig preoptic area and median eminence: electron microscopy. *Endocrinology*. 1992 Jan;130(1):364-72.
- 178 Donahue JE, Stopa EG, Chorsky RL, King JC, Schipper HM, Tobet SA, et al. Cells containing immunoreactive estrogen receptor-alpha in the human basal forebrain. *Brain Res*. 2000 Feb;856(1-2):142-51.
- 179 Kruijver FPM, Swaab DF. Sex hormone receptors are present in the human suprachiasmatic nucleus. *Neuroendocrinology*. 2002 May;75(5):296-305.
- 180 Gudiño-Cabrera G, Nieto-Sampedro M. Estrogen receptor immunoreactivity in Schwann-like brain macroglia. *J Neurobiol*. 1999 Sep;40(4):458-70.
- 181 Ojeda SR, Ma YJ, Lee BJ, Prevot V. Glia-to-neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty. *Recent Prog Horm Res*. 2000;55:197-223; discussion 223-224.

- 182 Clasadonte J, Poulain P, Hanchate NK, Corfas G, Ojeda SR, Prevot V. Prostaglandin E2 release from astrocytes triggers gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron firing via EP2 receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Sep;108(38):16104–9.
- 183 Clasadonte J, Sharif A, Baroncini M, Prevot V. Gliotransmission by prostaglandin e(2): a prerequisite for GnRH neuronal function? *Front Endocrinol*. 2011;2:91.
- 184 Sharif A, Baroncini M, Prevot V. Role of glia in the regulation of gonadotropin-releasing hormone neuronal activity and secretion. *Neuroendocrinology*. 2013;98(1):1–15.
- 185 Ojeda SR, Jameson HE, McCann SM. Hypothalamic areas involved in prostaglandin (PG)-induced gonadotropin release. I: effects of PGE2 and PGF2alpha implants on luteinizing hormone release. *Endocrinology*. 1977 Jun;100(6):1585–94.
- 186 Ma YJ, Junier MP, Costa ME, Ojeda SR. Transforming growth factor-alpha gene expression in the hypothalamus is developmentally regulated and linked to sexual maturation. *Neuron*. 1992 Oct;9(4):657–70.
- 187 Galbiati M, Martini L, Melcangi RC. Oestrogens, via transforming growth factor alpha, modulate basic fibroblast growth factor synthesis in hypothalamic astrocytes: in vitro observations. *J Neuroendocrinol*. 2002 Oct;14(10):829–35.
- 188 Prevot V, Cornea A, Mungenast A, Smiley G, Ojeda SR. Activation of erbB-1 signaling in tanycytes of the median eminence stimulates transforming growth factor beta1 release via prostaglandin E2 production and induces cell plasticity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2003 Nov;23(33):10622–32.
- 189 Roth CL, McCormack AL, Lomniczi A, Mungenast AE, Ojeda SR. Quantitative proteomics identifies a change in glial glutamate metabolism at the time of female puberty. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 Jul;254–255:51–9.
- 190 Messina A, Ferraris N, Wray S, Cagnoni G, Donohue DE, Casoni F, et al. Dysregulation of Semaphorin7A/ β 1-integrin signaling leads to defective GnRH-1 cell migration, abnormal gonadal development and altered fertility. *Hum Mol Genet*. 2011 Dec;20(24):4759–74.
- 191 Parkash J, Cimino I, Ferraris N, Casoni F, Wray S, Cappy H, et al. Suppression of β 1-integrin in gonadotropin-releasing hormone cells disrupts migration and axonal extension resulting in severe reproductive alterations. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2012 Nov;32(47):16992–7002.
- 192 De Seranno S, Estrella C, Loyens A, Cornea A, Ojeda SR, Beauvillain J-C, et al. Vascular endothelial cells promote acute plasticity in ependymogial cells of the neuroendocrine brain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2004 Nov;24(46):10353–63.
- 193 de Seranno S, d'Anglemonet de Tassigny X, Estrella C, Loyens A, Kasparov S, Leroy D, et al. Role of estradiol in the dynamic control of tanycyte plasticity mediated by vascular endothelial cells in the median eminence. *Endocrinology*. 2010 Apr;151(4):1760–72.

- 194 Käsäkoski J, Fagerholm R, Laitinen E-M, Vaaralahti K, Hackman P, Pitteloud N, et al. Mutation screening of SEMA3A and SEMA7A in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Pediatr Res*. 2014 May;75(5):641–4.
- 195 Baroncini M, Jissendi P, Catteau-Jonard S, Dewailly D, Pruvo J-P, Francke J-P, et al. Sex steroid hormones-related structural plasticity in the human hypothalamus. *NeuroImage*. 2010 Apr;50(2):428–33.
- 196 Clasadonte J, Prevot V. The special relationship: glia-neuron interactions in the neuroendocrine hypothalamus. *Nat Rev Endocrinol*. 2018 Jan;14(1):25–44.
- 197 Moore AM, Prescott M, Marshall CJ, Yip SH, Campbell RE. Enhancement of a robust arcuate GABAergic input to gonadotropin-releasing hormone neurons in a model of polycystic ovarian syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jan;112(2):596–601.
- 198 Tata B, Mimouni NEH, Barbotin A-L, Malone SA, Loyens A, Pigny P, et al. Elevated prenatal anti-Müllerian hormone reprograms the fetus and induces polycystic ovary syndrome in adulthood. *Nat Med*. 2018 May DOI: 10.1038/s41591-018-0035-5
- 199 Dumesic DA, Oberfield SE, Stener-Victorin E, Marshall JC, Laven JS, Legro RS. Scientific Statement on the Diagnostic Criteria, Epidemiology, Pathophysiology, and Molecular Genetics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocr Rev*. 2015 Oct;36(5):487–525.
- 200 Escobar-Morreale HF. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2018 May;14(5):270–84.
- 201 March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DIW, Norman RJ, Davies MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2010 Feb;25(2):544–51.
- 202 Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jun;89(6):2745–9.
- 203 Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod Oxf Engl*. 2004 Jan;19(1):41–7.
- 204 Dewailly D. Diagnostic criteria for PCOS: Is there a need for a rethink? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2016 Nov;37:5–11.
- 205 Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril*. 2009 Feb;91(2):456–88.
- 206 Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedars MI, Laven J, Norman RJ, et al. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum Reprod Update*. 2014 Jun;20(3):334–52.

- 207 Pigny P, Jonard S, Robert Y, Dewailly D. Serum anti-Müllerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Mar;91(3):941–5.
- 208 Durlinger ALL, Visser JA, Themmen APN. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reprod Camb Engl.* 2002 Nov;124(5):601–9.
- 209 Jeppesen JV, Anderson RA, Kelsey TW, Christiansen SL, Kristensen SG, Jayaprakasan K, et al. Which follicles make the most anti-Müllerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection. *Mol Hum Reprod.* 2013 Aug;19(8):519–27.
- 210 Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1961 Nov;21:1440–7.
- 211 Teede HJ, Misso ML, Costello MF, Dokras A, Laven J, Moran L, et al. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2018 01;33(9):1602–18.
- 212 McCartney CR, Marshall JC. CLINICAL PRACTICE. Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med.* 2016 Jul;375(1):54–64.
- 213 Lizneva D, Gavrilova-Jordan L, Walker W, Azziz R. Androgen excess: Investigations and management. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2016 Nov;37:98–118.
- 214 Tostain J, Rossi D, Martin PM. [Physiology of androgens in adult men]. *Progres En Urol J Assoc Francaise Urol Soc Francaise Urol.* 2004 Nov;14(5):639–60.
- 215 Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR, Baltimore Longitudinal Study of Aging. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. *Baltimore Longitudinal Study of Aging. J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Feb;86(2):724–31.
- 216 Azziz R, Carmina E, Chen Z, Dunaif A, Laven JSE, Legro RS, et al. Polycystic ovary syndrome. *Nat Rev Dis Primer.* 2016 11;2:16057.
- 217 Sjaarda LA, Mumford SL, Kissell K, Schliep KC, Hammoud AO, Perkins NJ, et al. Increased androgen, anti-Müllerian hormone, and sporadic anovulation in healthy, eumenorrheic women: a mild PCOS-like phenotype? *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Jun;99(6):2208–16.
- 218 Hudecova M, Holte J, Olovsson M, Larsson A, Berne C, Sundstrom-Poromaa I. Prevalence of the metabolic syndrome in women with a previous diagnosis of polycystic ovary syndrome: long-term follow-up. *Fertil Steril.* 2011 Nov;96(5):1271–4.
- 219 Gambineri A, Patton L, Altieri P, Pagotto U, Pizzi C, Manzoli L, et al. Polycystic ovary syndrome is a risk factor for type 2 diabetes: results from a long-term prospective study. *Diabetes.* 2012 Sep;61(9):2369–74.

- 220 Lizneva D, Suturina L, Walker W, Brakta S, Gavrilova-Jordan L, Azziz R. Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2016 Jul;106(1):6–15.
- 221 Ewens KG, Jones MR, Ankener W, Stewart DR, Urbanek M, Dunaif A, et al. Type 2 diabetes susceptibility single-nucleotide polymorphisms are not associated with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2011 Jun;95(8):2538-2541.e1-6.
- 222 Cai X, Liu C, Mou S. Association between fat mass- and obesity-associated (FTO) gene polymorphism and polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *PloS One*. 2014;9(1):e86972.
- 223 Louwers YV, Rayner NW, Herrera BM, Stolk L, Groves CJ, Barber TM, et al. BMI-associated alleles do not constitute risk alleles for polycystic ovary syndrome independently of BMI: a case-control study. *PloS One*. 2014;9(1):e87335.
- 224 Bird ST, Hartzema AG, Brophy JM, Etminan M, Delaney JAC. Risk of venous thromboembolism in women with polycystic ovary syndrome: a population-based matched cohort analysis. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can*. 2013 Feb;185(2):E115-120.
- 225 Anderson SA, Barry JA, Hardiman PJ. Risk of coronary heart disease and risk of stroke in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2014 Sep;176(2):486–7.
- 226 Zore T, Joshi NV, Lizneva D, Azziz R. Polycystic Ovarian Syndrome: Long-Term Health Consequences. *Semin Reprod Med*. 2017;35(3):271–81.
- 227 Veltman-Verhulst SM, Boivin J, Eijkemans MJC, Fauser BJCM. Emotional distress is a common risk in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of 28 studies. *Hum Reprod Update*. 2012 Dec;18(6):638–51.
- 228 Dokras A, Clifton S, Futterweit W, Wild R. Increased risk for abnormal depression scores in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2011 Jan;117(1):145–52.
- 229 Moran LJ, Deeks AA, Gibson-Helm ME, Teede HJ. Psychological parameters in the reproductive phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2012 Jul;27(7):2082–8.
- 230 Joham AE, Teede HJ, Ranasinha S, Zoungas S, Boyle J. Prevalence of infertility and use of fertility treatment in women with polycystic ovary syndrome: data from a large community-based cohort study. *J Womens Health 2002*. 2015 Apr;24(4):299–307.
- 231 Roos N, Kieler H, Sahlin L, Ekman-Ordeberg G, Falconer H, Stephansson O. Risk of adverse pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome: population based cohort study. *BMJ*. 2011 Oct;343:d6309.
- 232 de Wilde MA, Lamain-de Ruyter M, Veltman-Verhulst SM, Kwee A, Laven JS, Lambalk CB, et al. Increased rates of complications in singleton pregnancies of women previously

- diagnosed with polycystic ovary syndrome predominantly in the hyperandrogenic phenotype. *Fertil Steril*. 2017;108(2):333–40.
- 233 Moran LJ, Hutchison SK, Norman RJ, Teede HJ. Lifestyle changes in women with polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011 Jul;(7):CD007506.
- 234 Carmina E. PCOS: metabolic impact and long-term management. *Minerva Ginecol*. 2012 Dec;64(6):501–5.
- 235 Kiddy DS, Hamilton-Fairley D, Bush A, Short F, Anyaoku V, Reed MJ, et al. Improvement in endocrine and ovarian function during dietary treatment of obese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1992 Jan;36(1):105–11.
- 236 Farquhar C, Brown J, Marjoribanks J. Laparoscopic drilling by diathermy or laser for ovulation induction in anovulatory polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Jun;(6):CD001122.
- 237 Jamal M, Gunay Y, Capper A, Eid A, Heitshusen D, Samuel I. Roux-en-Y gastric bypass ameliorates polycystic ovary syndrome and dramatically improves conception rates: a 9-year analysis. *Surg Obes Relat Dis Off J Am Soc Bariatr Surg*. 2012 Aug;8(4):440–4.
- 238 Skubleny D, Switzer NJ, Gill RS, Dykstra M, Shi X, Sagle MA, et al. The Impact of Bariatric Surgery on Polycystic Ovary Syndrome: a Systematic Review and Meta-analysis. *Obes Surg*. 2016 Jan;26(1):169–76.
- 239 Legro RS, Driscoll D, Strauss JF, Fox J, Dunaif A. Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec;95(25):14956–60.
- 240 Kahsar-Miller MD, Nixon C, Boots LR, Go RC, Azziz R. Prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS) in first-degree relatives of patients with PCOS. *Fertil Steril*. 2001 Jan;75(1):53–8.
- 241 Gaberšček S, Zaletel K, Schwetz V, Pieber T, Obermayer-Pietsch B, Lerchbaum E. Mechanisms in endocrinology: thyroid and polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2015 Jan;172(1):R9-21.
- 242 Vink JM, Sadrzadeh S, Lambalk CB, Boomsma DI. Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Jun;91(6):2100–4.
- 243 Unsal T, Konac E, Yesilkaya E, Yilmaz A, Bideci A, Ilke Onen H, et al. Genetic polymorphisms of FSHR, CYP17, CYP1A1, CAPN10, INSR, SERPINE1 genes in adolescent girls with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet*. 2009 Apr;26(4):205–16.
- 244 Gu B-H, Park J-M, Baek K-H. Genetic variations of follicle stimulating hormone receptor are associated with polycystic ovary syndrome. *Int J Mol Med*. 2010 Jul;26(1):107–12.

- 245 Chen Z-J, Zhao H, He L, Shi Y, Qin Y, Shi Y, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3, 2p21 and 9q33.3. *Nat Genet.* 2011 Jan;43(1):55–9.
- 246 Dolfín E, Guani B, Lussiana C, Mari C, Restagno G, Revelli A. FSH-receptor Ala307Thr polymorphism is associated to polycystic ovary syndrome and to a higher responsiveness to exogenous FSH in Italian women. *J Assist Reprod Genet.* 2011 Sep;28(10):925–30.
- 247 Goodarzi MO, Jones MR, Li X, Chua AK, Garcia OA, Chen Y-DI, et al. Replication of association of DENND1A and THADA variants with polycystic ovary syndrome in European cohorts. *J Med Genet.* 2012 Feb;49(2):90–5.
- 248 Shi Y, Zhao H, Shi Y, Cao Y, Yang D, Li Z, et al. Genome-wide association study identifies eight new risk loci for polycystic ovary syndrome. *Nat Genet.* 2012 Sep;44(9):1020–5.
- 249 Welt CK, Styrkarsdóttir U, Ehrmann DA, Thorleifsson G, Arason G, Gudmundsson JA, et al. Variants in DENND1A are associated with polycystic ovary syndrome in women of European ancestry. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jul;97(7):E1342-1347.
- 250 Cui L, Zhao H, Zhang B, Qu Z, Liu J, Liang X, et al. Genotype-phenotype correlations of PCOS susceptibility SNPs identified by GWAS in a large cohort of Han Chinese women. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2013 Feb;28(2):538–44.
- 251 McAllister JM, Modi B, Miller BA, Biegler J, Bruggeman R, Legro RS, et al. Overexpression of a DENND1A isoform produces a polycystic ovary syndrome theca phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Apr;111(15):E1519-1527.
- 252 Hayes MG, Urbanek M, Ehrmann DA, Armstrong LL, Lee JY, Sisk R, et al. Genome-wide association of polycystic ovary syndrome implicates alterations in gonadotropin secretion in European ancestry populations. *Nat Commun.* 2015 Aug;6:7502.
- 253 Cui L, Li G, Zhong W, Bian Y, Su S, Sheng Y, et al. Polycystic ovary syndrome susceptibility single nucleotide polymorphisms in women with a single PCOS clinical feature. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2015 Mar;30(3):732–6.
- 254 Lee H, Oh J-Y, Sung Y-A, Chung HW. A genetic risk score is associated with polycystic ovary syndrome-related traits. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2016 Jan;31(1):209–15.
- 255 Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004 May;429(6990):457–63.
- 256 Vázquez-Martínez ER, Gómez-Viais YI, García-Gómez E, Reyes-Mayoral C, Reyes-Muñoz E, Camacho-Arroyo I, et al. DNA Methylation in the Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome. *Reprod Camb Engl.* 2019 Apr DOI: 10.1530/REP-18-0449
- 257 Wang F, Pan J, Liu Y, Meng Q, Lv P, Qu F, et al. Alternative splicing of the androgen receptor in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Apr;112(15):4743–8.

- 258 Li Z, Huang H. Epigenetic abnormality: a possible mechanism underlying the fetal origin of polycystic ovary syndrome. *Med Hypotheses*. 2008;70(3):638–42.
- 259 Xu N, Kwon S, Abbott DH, Geller DH, Dumesic DA, Azziz R, et al. Epigenetic mechanism underlying the development of polycystic ovary syndrome (PCOS)-like phenotypes in prenatally androgenized rhesus monkeys. *PloS One*. 2011;6(11):e27286.
- 260 Cook CL, Siow Y, Brenner AG, Fallat ME. Relationship between serum müllerian-inhibiting substance and other reproductive hormones in untreated women with polycystic ovary syndrome and normal women. *Fertil Steril*. 2002 Jan;77(1):141–6.
- 261 Pellatt L, Hanna L, Brincat M, Galea R, Brain H, Whitehead S, et al. Granulosa cell production of anti-Müllerian hormone is increased in polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jan;92(1):240–5.
- 262 Pellatt L, Rice S, Mason HD. Anti-Müllerian hormone and polycystic ovary syndrome: a mountain too high? *Reprod Camb Engl*. 2010 May;139(5):825–33.
- 263 Catteau-Jonard S, Bancquart J, Poncelet E, Lefebvre-Maunoury C, Robin G, Dewailly D. Polycystic ovaries at ultrasound: normal variant or silent polycystic ovary syndrome? *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2012 Aug;40(2):223–9.
- 264 Abbott DH, Rayome BH, Dumesic DA, Lewis KC, Edwards AK, Wallen K, et al. Clustering of PCOS-like traits in naturally hyperandrogenic female rhesus monkeys. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2017 01;32(4):923–36.
- 265 Catteau-Jonard S, Dewailly D. [Anti-Müllerian hormone and polycystic ovary syndrome]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2011 Sep;39(9):514–7.
- 266 Laven JSE, Mulders AGMGJ, Visser JA, Themmen AP, De Jong FH, Fauser BCJM. Anti-Müllerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jan;89(1):318–23.
- 267 Catteau-Jonard S, Pigny P, Reyss A-C, Decanter C, Poncelet E, Dewailly D. Changes in serum anti-müllerian hormone level during low-dose recombinant follicular-stimulating hormone therapy for anovulation in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Nov;92(11):4138–43.
- 268 Taieb J, Grynberg M, Pierre A, Arouche N, Massart P, Belville C, et al. FSH and its second messenger cAMP stimulate the transcription of human anti-Müllerian hormone in cultured granulosa cells. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 2011 Apr;25(4):645–55.
- 269 Huang C-C, Tien Y-J, Chen M-J, Chen C-H, Ho H-N, Yang Y-S. Symptom patterns and phenotypic subgrouping of women with polycystic ovary syndrome: association between endocrine characteristics and metabolic aberrations. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2015 Apr;30(4):937–46.

- 270 Burt Solorzano CM, Beller JP, Abshire MY, Collins JS, McCartney CR, Marshall JC. Neuroendocrine dysfunction in polycystic ovary syndrome. *Steroids*. 2012 Mar;77(4):332–7.
- 271 Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 2005 Mar;352(12):1223–36.
- 272 Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Apr;7(4):219–31.
- 273 Taylor AE, McCourt B, Martin KA, Anderson EJ, Adams JM, Schoenfeld D, et al. Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Jul;82(7):2248–56.
- 274 Waldstreicher J, Santoro NF, Hall JE, Filicori M, Crowley WF. Hyperfunction of the hypothalamic-pituitary axis in women with polycystic ovarian disease: indirect evidence for partial gonadotroph desensitization. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988 Jan;66(1):165–72.
- 275 Gilling-Smith C, Willis DS, Beard RW, Franks S. Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Oct;79(4):1158–65.
- 276 Pastor CL, Griffin-Korf ML, Aloji JA, Evans WS, Marshall JC. Polycystic ovary syndrome: evidence for reduced sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Feb;83(2):582–90.
- 277 Dunaif A. Do androgens directly regulate gonadotropin secretion in the polycystic ovary syndrome? *J Clin Endocrinol Metab*. 1986 Jul;63(1):215–21.
- 278 Daniels TL, Berga SL. Resistance of gonadotropin releasing hormone drive to sex steroid-induced suppression in hyperandrogenic anovulation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Dec;82(12):4179–83.
- 279 Eagleson CA, Gingrich MB, Pastor CL, Arora TK, Burt CM, Evans WS, et al. Polycystic ovarian syndrome: evidence that flutamide restores sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Nov;85(11):4047–52.
- 280 Clarke IJ, Cummins JT. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology*. 1982 Nov;111(5):1737–9.
- 281 Pielecka J, Quaynor SD, Moenter SM. Androgens increase gonadotropin-releasing hormone neuron firing activity in females and interfere with progesterone negative feedback. *Endocrinology*. 2006 Mar;147(3):1474–9.
- 282 Caldwell ASL, Edwards MC, Desai R, Jimenez M, Gilchrist RB, Handelsman DJ, et al. Neuroendocrine androgen action is a key extraovarian mediator in the development of polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 18;114(16):E3334–43.

- 283 Chhabra S, McCartney CR, Yoo RY, Eagleson CA, Chang RJ, Marshall JC. Progesterone inhibition of the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator: evidence for varied effects in hyperandrogenemic adolescent girls. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 May;90(5):2810–5.
- 284 Blank SK, McCartney CR, Chhabra S, Helm KD, Eagleson CA, Chang RJ, et al. Modulation of gonadotropin-releasing hormone pulse generator sensitivity to progesterone inhibition in hyperandrogenic adolescent girls--implications for regulation of pubertal maturation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Jul;94(7):2360–6.
- 285 Moore AM, Prescott M, Campbell RE. Estradiol negative and positive feedback in a prenatal androgen-induced mouse model of polycystic ovarian syndrome. *Endocrinology.* 2013 Feb;154(2):796–806.
- 286 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 Jan;151(1):301–11.
- 287 Robinson JE, Forsdike RA, Taylor JA. In utero exposure of female lambs to testosterone reduces the sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network to inhibition by progesterone. *Endocrinology.* 1999 Dec;140(12):5797–805.
- 288 Osuka S, Iwase A, Nakahara T, Kondo M, Saito A, Bayasula null, et al. Kisspeptin in the Hypothalamus of 2 Rat Models of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology.* 2017 01;158(2):367–77.
- 289 Mayer C, Acosta-Martinez M, Dubois SL, Wolfe A, Radovick S, Boehm U, et al. Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor alpha-signaling in kisspeptin neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Dec;107(52):22693–8.
- 290 Tang R, Ding X, Zhu J. Kisspeptin and Polycystic Ovary Syndrome. *Front Endocrinol.* 2019;10:298.
- 291 Cernea M, Padmanabhan V, Goodman RL, Coolen LM, Lehman MN. Prenatal Testosterone Treatment Leads to Changes in the Morphology of KNDy Neurons, Their Inputs, and Projections to GnRH Cells in Female Sheep. *Endocrinology.* 2015 Sep;156(9):3277–91.
- 292 Foradori CD, Coolen LM, Fitzgerald ME, Skinner DC, Goodman RL, Lehman MN. Colocalization of progesterone receptors in parvicellular dynorphin neurons of the ovine preoptic area and hypothalamus. *Endocrinology.* 2002 Nov;143(11):4366–74.
- 293 Jeon YE, Lee KE, Jung JA, Yim SY, Kim H, Seo SK, et al. Kisspeptin, leptin, and retinol-binding protein 4 in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Obstet Invest.* 2013;75(4):268–74.
- 294 Gorkem U, Togrul C, Arslan E, Sargin Oruc A, Buyukkayaci Duman N. Is there a role for kisspeptin in pathogenesis of polycystic ovary syndrome? *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol.* 2018 Feb;34(2):157–60.

- 295 Emekci Ozay O, Ozay AC, Acar B, Cagliyan E, Seçil M, Küme T. Role of kisspeptin in polycystic ovary syndrome (PCOS). *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2016 Sep;32(9):718–22.
- 296 Daghestani MH. Evaluation of biochemical, endocrine, and metabolic biomarkers for the early diagnosis of polycystic ovary syndrome among non-obese Saudi women. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet*. 2018 Aug;142(2):162–9.
- 297 Ruddenklau A, Campbell RE. Neuroendocrine Impairments of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology*. 2019 Oct;160(10):2230–42.
- 298 Brown RE, Wilkinson DA, Imran SA, Caraty A, Wilkinson M. Hypothalamic kiss1 mRNA and kisspeptin immunoreactivity are reduced in a rat model of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Brain Res*. 2012 Jul;1467:1–9.
- 299 Wilkinson M, Brown RE, Imran SA, Wilkinson DA. Letter to the Editor: Hypothalamic Kisspeptin in Female Rat Models of PCOS. *Endocrinology*. 2017 01;158(6):2011.
- 300 Kawwass JF, Sanders KM, Loucks TL, Rohan LC, Berga SL. Increased cerebrospinal fluid levels of GABA, testosterone and estradiol in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2017 01;32(7):1450–6.
- 301 Caldwell ASL, Eid S, Kay CR, Jimenez M, McMahon AC, Desai R, et al. Haplosufficient genomic androgen receptor signaling is adequate to protect female mice from induction of polycystic ovary syndrome features by prenatal hyperandrogenization. *Endocrinology*. 2015 Apr;156(4):1441–52.
- 302 Thind KK, Goldsmith PC. Expression of estrogen and progesterone receptors in glutamate and GABA neurons of the pubertal female monkey hypothalamus. *Neuroendocrinology*. 1997 May;65(5):314–24.
- 303 Isojärvi JI, Laatikainen TJ, Pakarinen AJ, Juntunen KT, Myllylä VV. Polycystic ovaries and hyperandrogenism in women taking valproate for epilepsy. *N Engl J Med*. 1993 Nov;329(19):1383–8.
- 304 Bilo L, Meo R. Polycystic ovary syndrome in women using valproate: a review. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2008 Oct;24(10):562–70.
- 305 Hu X, Wang J, Dong W, Fang Q, Hu L, Liu C. A meta-analysis of polycystic ovary syndrome in women taking valproate for epilepsy. *Epilepsy Res*. 2011 Nov;97(1–2):73–82.
- 306 Berg T, Silveira MA, Moenter SM. Prepubertal Development of GABAergic Transmission to Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neurons and Postsynaptic Response Are Altered by Prenatal Androgenization. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2018 28;38(9):2283–93.
- 307 Marshall CJ, Desroziers E, McLennan T, Campbell RE. Defining Subpopulations of Arcuate Nucleus GABA Neurons in Male, Female, and Prenatally Androgenized Female Mice. *Neuroendocrinology*. 2017;105(2):157–69.

- 308 Goy RW, Resko JA. Gonadal hormones and behavior of normal and pseudohermaphroditic nonhuman female primates. *Recent Prog Horm Res.* 1972;28:707–33.
- 309 Abbott DH, Dumesic DA, Eisner JR, Colman RJ, Kemnitz JW. Insights into the development of polycystic ovary syndrome (PCOS) from studies of prenatally androgenized female rhesus monkeys. *Trends Endocrinol Metab TEM.* 1998 Feb;9(2):62–7.
- 310 Barnes RB, Rosenfield RL, Ehrmann DA, Cara JF, Cuttler L, Levitsky LL, et al. Ovarian hyperandrogenism as a result of congenital adrenal virilizing disorders: evidence for perinatal masculinization of neuroendocrine function in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Nov;79(5):1328–33.
- 311 Pache TD, Chadha S, Gooren LJ, Hop WC, Jaarsma KW, Dommerholt HB, et al. Ovarian morphology in long-term androgen-treated female to male transsexuals. A human model for the study of polycystic ovarian syndrome? *Histopathology.* 1991 Nov;19(5):445–52.
- 312 Sir-Petermann T, Maliqueo M, Angel B, Lara HE, Pérez-Bravo F, Recabarren SE. Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovarian syndrome: possible implications in prenatal androgenization. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2002 Oct;17(10):2573–9.
- 313 Maliqueo M, Lara HE, Sánchez F, Echiburú B, Crisosto N, Sir-Petermann T. Placental steroidogenesis in pregnant women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013 Feb;166(2):151–5.
- 314 Barry JA, Kay AR, Navaratnarajah R, Iqbal S, Bamfo JE a. K, David AL, et al. Umbilical vein testosterone in female infants born to mothers with polycystic ovary syndrome is elevated to male levels. *J Obstet Gynaecol J Inst Obstet Gynaecol.* 2010;30(5):444–6.
- 315 Anderson H, Fogel N, Grebe SK, Singh RJ, Taylor RL, Dunaif A. Infants of women with polycystic ovary syndrome have lower cord blood androstenedione and estradiol levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 May;95(5):2180–6.
- 316 Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod Update.* 2005 Aug;11(4):357–74.
- 317 Abbott DH, Zhou R, Bird IM, Dumesic DA, Conley AJ. Fetal programming of adrenal androgen excess: lessons from a nonhuman primate model of polycystic ovary syndrome. *Endocr Dev.* 2008;13:145–58.
- 318 Moore AM, Campbell RE. Polycystic ovary syndrome: Understanding the role of the brain. *Front Neuroendocrinol.* 2017 Jul;46:1–14.
- 319 Kafali H, Iriadam M, Ozardali I, Demir N. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Arch Med Res.* 2004 Apr;35(2):103–8.

- 320 Baravalle C, Salvetti NR, Mira GA, Lorente JA, Ortega HH. The role of ACTH in the pathogenesis of polycystic ovarian syndrome in rats: hormonal profiles and ovarian morphology. *Physiol Res*. 2007;56(1):67–78.
- 321 Mannerås L, Cajander S, Holmäng A, Seleskovic Z, Lystig T, Lönn M, et al. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*. 2007 Aug;148(8):3781–91.
- 322 Zurvarra FM, Salvetti NR, Mason JI, Velazquez MML, Alfaro NS, Ortega HH. Disruption in the expression and immunolocalisation of steroid receptors and steroidogenic enzymes in letrozole-induced polycystic ovaries in rat. *Reprod Fertil Dev*. 2009;21(7):827–39.
- 323 Kauffman AS, Thackray VG, Ryan GE, Tolson KP, Glidewell-Kenney CA, Semaan SJ, et al. A Novel Letrozole Model Recapitulates Both the Reproductive and Metabolic Phenotypes of Polycystic Ovary Syndrome in Female Mice. *Biol Reprod*. 2015 Sep;93(3):69.
- 324 Abbott DH. Neuronal androgen receptor: Molecular gateway to polycystic ovary syndrome? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 18;114(16):4045–7.
- 325 Walters KA, Edwards MC, Tesic D, Caldwell ASL, Jimenez M, Smith JT, et al. The Role of Central Androgen Receptor Actions in Regulating the Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis. *Neuroendocrinology*. 2018;106(4):389–400.
- 326 Piltonen TT, Giacobini P, Edvinsson Å, Hustad S, Lager S, Morin-Papunen L, et al. Circulating antimüllerian hormone and steroid hormone levels remain high in pregnant women with polycystic ovary syndrome at term. *Fertil Steril*. 2019 Mar;111(3):588-596.e1.
- 327 Barbotin A-L, Peigné M, Malone SA, Giacobini P. Emerging Roles of Anti-Müllerian Hormone in Hypothalamic-Pituitary Function. *Neuroendocrinology*. 2019;109(3):218–29.
- 328 Sir-Petermann T, Maliqueo M, Codner E, Echiburú B, Crisosto N, Pérez V, et al. Early metabolic derangements in daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Dec;92(12):4637–42.
- 329 Novak A, Guo C, Yang W, Nagy A, Lobe CG. Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genes N Y N* 2000. 2000 Dec;28(3–4):147–55.
- 330 Wallace JG, Potts RH, Szamosi JC, Surette MG, Sloboda DM. The murine female intestinal microbiota does not shift throughout the estrous cycle. *PloS One*. 2018;13(7):e0200729.
- 331 Balland E, Dam J, Langlet F, Caron E, Steculorum S, Messina A, et al. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab*. 2014 Feb;19(2):293–301.
- 332 Prevot V, Dutoit S, Croix D, Tramu G, Beauvillain JC. Semi-quantitative ultrastructural analysis of the localization and neuropeptide content of gonadotropin releasing hormone

- nerve terminals in the median eminence throughout the estrous cycle of the rat. *Neuroscience*. 1998 May;84(1):177–91.
- 333 Peitz M, Pfannkuche K, Rajewsky K, Edenhofer F. Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr;99(7):4489–94.
- 334 Florent V, Baroncini M, Jissendi-Tchofo P, Lopes R, Vanhoutte M, Rasika S, et al. Hypothalamic structural and functional imbalances in anorexia nervosa. *Neuroendocrinology*. 2019 Sep DOI: 10.1159/000503147
- 335 Witkin JW, Ferin M, Popilskis SJ, Silverman AJ. Effects of gonadal steroids on the ultrastructure of GnRH neurons in the rhesus monkey: synaptic input and glial apposition. *Endocrinology*. 1991 Aug;129(2):1083–92.
- 336 Baroncini M, Allet C, Leroy D, Beauvillain J-C, Francke J-P, Prevot V. Morphological evidence for direct interaction between gonadotrophin-releasing hormone neurones and astroglial cells in the human hypothalamus. *J Neuroendocrinol*. 2007 Sep;19(9):691–702.
- 337 Cimino I, Casoni F, Liu X, Messina A, Parkash J, Jamin SP, et al. Novel role for anti-Müllerian hormone in the regulation of GnRH neuron excitability and hormone secretion. *Nat Commun*. 2016 Jan;7:10055.
- 338 Petroff OA, Graham GD, Blamire AM, al-Rayess M, Rothman DL, Fayad PB, et al. Spectroscopic imaging of stroke in humans: histopathology correlates of spectral changes. *Neurology*. 1992 Jul;42(7):1349–54.
- 339 Fried PJ, Pascual-Leone A, Bolo NR. Diabetes and the link between neuroplasticity and glutamate in the aging human motor cortex. *Clin Neurophysiol Off J Int Fed Clin Neurophysiol*. 2019 Sep;130(9):1502–10.
- 340 Goodman RL, Karsch FJ. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology*. 1980 Nov;107(5):1286–90.
- 341 Herbison AE. The Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Generator. *Endocrinology*. 2018 01;159(11):3723–36.
- 342 Conn PM, Crowley WF. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *N Engl J Med*. 1991 Jan;324(2):93–103.
- 343 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(2):193–202.
- 344 Ratnasabapathy R, Dhillon WS. The effects of kisspeptin in human reproductive function - therapeutic implications. *Curr Drug Targets*. 2013 Mar;14(3):365–71.

- 345 Chen X, Mo Y, Li L, Chen Y, Li Y, Yang D. Increased plasma metastin levels in adolescent women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010 Mar;149(1):72–6.
- 346 Umayal B, Jayakody SN, Chandrasekharan NV, Wijesundera WS, Wijeyaratne CN. Polycystic ovary syndrome (PCOS) and kisspeptin - A Sri Lankan study. *J Postgrad Med.* 2019 Mar;65(1):18–23.
- 347 De Bond J-AP, Smith JT. Kisspeptin and energy balance in reproduction. *Reprod Camb Engl.* 2014 Mar;147(3):R53-63.
- 348 Pielecka-Fortuna J, Chu Z, Moenter SM. Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology.* 2008 Apr;149(4):1979–86.
- 349 Pielecka-Fortuna J, Moenter SM. Kisspeptin increases gamma-aminobutyric acidergic and glutamatergic transmission directly to gonadotropin-releasing hormone neurons in an estradiol-dependent manner. *Endocrinology.* 2010 Jan;151(1):291–300.

ANNEXES

Publications au cours de la thèse

Emerging roles of Anti-Müllerian Hormone in the hypothalamic-pituitary function

Anne-Laure Barbotin^{1,2}, Maëliiss Peigné^{1,3}, Samuel Andrew Malone^{1*} and Paolo Giacobini^{1*}

¹ Université de Lille, Inserm, CHU Lille, UMR-S 1172, laboratoire du développement et plasticité du cerveau neuroendocrine, centre de recherche Jean-Pierre Aubert, 1, place de Verdun, 59045 Lille, France.

² Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS, CHU de Lille, avenue Eugène Avinée, 59037 Lille, France.

³ AP-HP, Unité de Médecine de la Reproduction, Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Bichat-Claude Bernard, 46 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France.

Correspondence should be addressed to:

Paolo Giacobini, Inserm, Jean-Pierre Aubert Research Center, Unit 1172, Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, 1 Place de Verdun, 59045, Lille Cedex, France.

Phone: +33 320622060; E-mail: paolo.giacobini@inserm.fr

* : these authors contributed equally to this review

Abstract

Since its initial discovery in the 1940's, research into the physiological actions of Anti-Müllerian hormone (AMH), from its eponymous role in male developmental biology, to its routine clinical use in female reproductive health, have already undergone one paradigm shifting change. With several exciting studies recently reporting hitherto unforeseen AMH actions at all levels in the hypogonadal-pituitary-gonadal axis, the importance to both hypothalamic and pituitary reproductive control by this often-overlooked hormone are finding increasing support and significance. In this review, we will briefly summarize what is known about the traditional roles and biology of AMH and how this could allow AMH actions at the level of the central nervous system (CNS). We also synthesize the important findings from these new studies and discuss their potential impact and significance to our understanding of one of the most common reproductive disorders currently affecting women, polycystic ovary syndrome (PCOS).

1. Introduction

Anti-Müllerian Hormone (AMH) is a homodimeric glycoprotein belonging to the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily [1] and was initially identified for its role in the regression of the Müllerian ducts in male embryos [2]. Prof. Jost found that the Müllerian ducts of the rabbit would independently differentiate into the female reproductive system (namely the uterus, fallopian tubes and upper two-thirds of the vagina) in the absence of testicular secretions [2]. Following gonadectomy of sexually undifferentiated rabbits, Jost grafted either ovarian or testicular tissue in rabbits and witnessed the subsequent correct development of either the female or male genitalia respectively. The paradigm shifting experiment came when, following gonadectomy, he implanted a testosterone propionate crystal alone, noting that whilst the Wolffian ducts were stimulated to develop, there was no regression of the Müllerian ducts – highlighting that a testicular factor other than testosterone was responsible for gonadal differentiation. Jost called this factor “hormone inhibitrice” or “inhibiteur müllerian” [3], and today it is better known as anti-Müllerian hormone or Müllerian inhibiting substance (AMH, MIS).

The *AMH* gene was first sequenced and cloned in mammals in 1986 [1,4]. It is located on human chromosome 19 and it is extremely well conserved through evolution, being present in almost all mammals [5–8], chicken [9], reptiles [10], marsupials [8], zebrafish [11] and amphibians [12]. All are formed of five exons, with the highest degree of homogeneity being observed between exons 2-5 between all species thus far studied.

AMH is a glycoprotein found in the blood, suggesting it has a hormonal function. The primary sources of production, identified so far, are the Sertoli cells of the testes and the granulosa cells of the ovaries in postnatal animals. However, AMH and its exclusive binding receptor, AMHR2, expression has also been detected in prostate, lungs [13–15] and several other organs, including the brain [16–19] and the pituitary [20], suggesting that the biological effects of AMH are much broader than initially thought.

In the present mini-review, we will briefly summarize previous studies describing the “canonical” functions of AMH in the gonadal function and will highlight our current understanding of emerging neuroendocrine actions of AMH in the regulation of fertility in physiological and pathological conditions.

2. AMH from gene to protein

The *AMH* gene encodes a pre-proprotein of 560 amino acids in humans. AMH is synthesized as a homo-dimeric pro hormone of 140 kDa (composed of two monomers of 70 kDa, stabilised by disulfide bridges), which undergoes a proteolytic cleavage at monobasic sites to become biologically active [21–23]. AMH_{N,C} (non-covalently associated N terminal pro-region with C terminal region) represents the cleaved biologically active form, whereas uncleaved AMH (proAMH) is well described as biologically inactive [24–26]. Like many molecules of the TGFβ superfamily, AMH must therefore undergo proteolytic cleavage into two N and C terminal dimers to acquire its biological function. The cleavage of AMH gives rise to a 110 kDa N-terminal homodimer formed by two 57 kDa subunits and a 25 kDa active C homodimer composed of two identical 12.5 kDa subunits. The non-covalent complex and pro-hormone are the two forms predominantly found in the blood of humans [27]. It has been shown that the N-terminal portion of the protein, although having no intrinsic activity, has the role of amplifying the activity of the C-terminus [28], with only the biologically active C-terminus region required to cause regression of the Müllerian ducts [28].

As determined experimentally *in vitro*, recombinant AMH can be cleaved by plasmin [29]. However, *in vivo*, the enzymes capable of cleaving AMH remain largely unknown. Although the site of cleavage to form the bio-active AMH is currently unknown, subtilisin/kexin-like proprotein convertases are thought to be responsible for AMH cleavage and studies have shown that furin and prohormone convertase (PC5), two such endoproteases, were co-expressed with AMH in the embryonic rat testicle [30]. Additionally, only PC5 is capable of cleaving this hormone after co-transfection into mammalian cells. It is also noteworthy that these convertases have been shown to be expressed by neurons [31].

As a member of the TGFβ family, AMH signals through a heterodimeric complex of transmembrane serine-threonine kinase receptors. AMH has been shown to bind exclusively to one type II receptor, AMHR2, whilst no other ligand has been shown to have effective binding to it [32]. AMHR2 has been shown to interact with three type I receptors of the Activin like kinase (ALK) family – AcvR1 (Activin receptor 1: ALK2), BMPR1a (Bone morphogenic protein receptor 1A: ALK3) and BMPR1b (Bone morphogenic protein receptor 1B: ALK6) [33,34]. Finally, the complex canonically recruits SMAD1/5/8 proteins that are translocated to the nucleus and that are involved in regulating gene expression [35,36].

3 Roles of AMH in postnatal gonads

3.1 Role of AMH in ovarian function

In women, circulating AMH levels correlate well with ovarian reserve [37,38], with the predictive power of AMH levels to ovarian reserve recently being widely adopted as the Gold Standard in primary health care systems [39] and as a useful co-predictor of stimulated ovarian response [38,40].

AMH is produced by granulosa cells and, in women, a strong correlation between serum AMH levels and number of small antral follicles between 2 and 9 mm as detected by ultrasound exists [41–43]. AMH is also a regulator of folliculogenesis as it inhibits the initial follicular recruitment from primordial follicles to primary follicles in mice [44,45]. This role has been confirmed by experiments in *AMH*^{-/-} mice, which have statistically increased levels of primary and secondary follicles at 25 days and 4 months of age versus heterozygous and wild type littermates. However, at 4 months and 13 months, decreased numbers of primordial follicles were observed in *AMH*^{-/-} mice, suggesting a premature exhaustion of ovarian reserve [46]. The authors concluded that although the number of initial primordial follicles available immediately following birth was independent of the presence of AMH, it was an important factor in inhibiting follicular recruitment and thus AMH presence was essential for prolonging fecundity. AMH is already expressed in infantile ovaries in mammals [44,47–52] and the findings from Garrel in 2016 raised the intriguing hypothesis that AMH could play a critical role in the female pituitary gonadotropic activity notably during the infantile period [20]. This issue will be further discussed in section 4.

In both rodent and human studies, it has been agreed that AMH secreted by primary and growing small antral follicles acts as a ‘brake’ inhibiting further follicular recruitment and development. Further, *in vitro* analysis of FSH dependent follicular maturation is halted by the addition of AMH, indicating that AMH is important in attenuating follicular sensitivity to cyclical FSH action [53]. This is supported by a recent study that indicated that AMH levels parallel fluctuations in the antral follicle count through the menstrual cycle [54].

In vitro experiments of cultured granulosa cells have indicated that exogenous AMH also decreases aromatase activity and Luteinising Hormone Receptor (LHR) number [55,56].

Consistent with this, it has been shown that there is a negative correlation between AMH and estradiol levels in the follicular fluid of small antral follicles in humans [57,58].

3.2 Role of AMH in testicular function

In boys, AMH is synthesized by Sertoli cells, and it is the first hormone secreted by differentiated Sertoli cells of the fetal testis triggering the regression of the Müllerian ducts [59]. It has been demonstrated in humans, that testicular AMH expression begins at 44 days post conception and that AMH levels in fetal testis were positively correlated with age [60].

Both Leydig and Sertoli cells of the testes express AMHR2 indicating a potential paracrine role in regulating male gonadal function [61]. Indeed, high doses of AMH result in decreased aromatase expression and hence testosterone secretion *in vitro* [62] and *in vivo* [63]. Concomitantly, AMH also causes a decrease in LHR expression, which should further act to decrease testosterone secretion [62]. In line with these findings, in boys with non-palpable testis, circulating AMH level determination can help to distinguish between cryptorchidism and anorchism, as well as differentiating the dysgenetic causes of disorders of sexual development from those due to defective androgen synthesis or action [64]. Physiologically, AMH levels fall in boys at puberty with the increase in testosterone and initiation of spermatogenesis [65]; however, it should be noted that this androgen mediated decrease in AMH levels is restricted to post-natal life, as immature Sertoli cells lack expression of the Androgen Receptor (AR) [66,67]. Interestingly, AMH deficient mice have circulating levels of testosterone within the normal range, suggesting that compensatory mechanisms may act to replace the interconnected feedback between the two hormones. Meanwhile male mice with targeted mutations of *AMHR2* develop Leydig cell hyperplasia, suggesting an inhibitory role of AMH on Leydig cell proliferation [68]. Whilst secreting AMH into the peripheral blood circulation, Sertoli cells also secrete AMH into the seminiferous tubules, where it exists at a much higher concentration compared to the plasma [69,70]; however, the role of AMH in semen is currently unclear. Reports of AMH levels correlating with sperm count [71], sperm not possessing AMHR2 [33,69] and improving sperm viability outside of the body [72] are seemingly contradictory and remain to be resolved before a consensus can be achieved.

4. “Emerging” roles of AMH in the neuroendocrine control of reproduction

4.1 Role of AMH in the hypothalamus

In the adult brain, it has been shown that mature neurons express high levels of AMH receptors in both sexes [16–18].

In recent years, novel neuroendocrine actions of AMH have started to be elucidated. In 2016, Cimino and colleagues uncovered that AMHR2 is expressed in a significant subset of hypothalamic GnRH neurons both in mice (**Figure 1A-D**) and in humans [19]. Interestingly, AMHR2 is also broadly expressed in different brain areas and cell-types involved in the central control of reproduction, including the organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) of the hypothalamus and the median eminence [19]. Unpublished data from our group, have shown that neurons expressing nitric oxide (NO) synthase (nNOS) located in the OVLT also express AMHR2 (**Figure 1E**). nNOS neurons distributed in the preoptic region at the median preoptic nucleus (MEPO) and in OVLT, where neurons expressing nNOS and GnRH are co-distributed [73–75] and interact functionally [76,77] are known to participate to the control of reproductive functions in mammals [78]. Future studies will be aimed at addressing the exact role of AMH on hypothalamic nNOS neurons and whether it could be involved in the nNOS-mediated effects required for the onset of the LH surge induced by gonadal steroids in mice [75]. At the level of the median eminence, AMHR2 has been shown to be expressed by endothelial cells, by tanycytes, as well as by the majority of arcuate nucleus neurons (**Figure 1F-H**). Interestingly, fenestrated endothelial cells and tanycytes are known to regulate GnRH secretion by interacting closely with GnRH terminals in the ME [79]. However, the role of AMH on these non-neuronal cell types has yet to be determined. The first functional study, assessing the role of AMH on GnRH neuronal activity was published in 2016, with Cimino and colleagues reporting that approximately half of the GnRH neuronal population located in the hypothalamic preoptic area express AMHR2 and respond to exogenous AMH by increasing their neuronal activity and GnRH secretion, resulting in an increase in LH secretion equivalent to levels required to produce an ovulatory surge [19].

Electrophysiological experiments performed on slice cultures of preoptic areas from *GnRH:GFP* animals revealed that the action of exogenous AMH on neuronal activity is direct [19]; however, based on the wide expression of AMHR2 in hypothalamic regions, synergistic actions from other neuronal and non-neuronal cell types, ultimately resulting in increased GnRH secretion, cannot be ruled out.

Another point worth considering relates to the central effects of peripheral AMH and whether it could access the brain or not. Notably, circulating AMH levels in mice have recently been shown to fluctuate during the estrous cycle with mean values significantly greater in proestrus and estrus as compared to diestrus [80].

In a recent study [81] it has been shown that peripherally administered bioactive AMH_C reaches the brain at the level of the ME and acts centrally by inducing GnRH neuronal activation, as shown by the increase in the number of GnRH neurons expressing c-fos. Blood-borne bioactive AMH has generally presumed to be the cleaved AMH_C [82], although more recent studies suggest that human blood might predominantly contain proAMH and AMH_{N,C} [25,83]. Under the light of these considerations, at least two possible scenarios exist regarding how the peripheral AMH may result in the central activation of GnRH neurons: 1) circulating AMH_{N,C} could bind to endothelial cells of the ME, which express AMHR2, to induce the release of NO, which is known to powerfully control GnRH secretion and structural plasticity at the neurohaemal junction [78]; 2) AMH_C could act directly on GnRH dendrites and terminals that extend outside the blood-brain barrier (BBB) at the OVLT [84] and in the ME, respectively, and/or modulate cytoskeletal remodelling in specialized ependymal glial cells called tanycytes to increase GnRH delivery to the pituitary [79] (**Figure 2**). Indeed, the ME and the OVLT contain highly permeable, fenestrated endothelial cells that allow the free passage of molecules below 35 kDa [85], such as bioactive AMH. However, whether prohormone convertases and furin, responsible for the cleavage to form the bio-active AMH (AMH_C), are expressed by fenestrated vessels of circumventricular organs and whether circulating AMH_{N,C} undergoes further cleavage at these sites remain to be investigated.

4.2 Role of AMH in the pituitary

Both AMHR2 transcripts and protein were found in the immortalized mouse pituitary gonadotrope-derived cell lines (L β T2) and in rat pituitaries [20,86]. Bédécarrats and colleagues demonstrated that AMH stimulation of L β T2 cells led to an increase of FSH beta subunit (FSH β) protein expression and to an increase in both the *FSH β* and *LH β* gonadotropin genes promoter-driven luciferase activity [86]; suggesting for the first time that AMH could be a new actor regulating gonadotrope activity. The group of Cohen-Tannoudji has further explored this

issue in a set of subsequent studies [20,87]. Using a combination of *in vitro* and *in vivo* approaches, these authors have reported a sexually dimorphic expression of *AMHR2* transcripts in postnatal rat pituitary with higher steady-state transcript levels in immature female rats than in males [20]. In addition, they provided compelling evidence that AMH increases the secretion of FSH in immature females. AMH was reported to upregulate FSH secretion and pituitary FSH β without affecting LH levels [20]. The same group has also recently demonstrated that gene expression of both human and murine *AMHR2* in gonadotrope cells is regulated by GnRH [87]. Indeed, using L β T2 cells in a perfusion system, these authors have shown that GnRH at high pulse frequency increases *AMHR2* expression whereas lower frequencies were ineffective [87]. However, the physiological implication of *AMHR2* up-regulation by high pulse frequency of GnRH remains to be understood.

In mammals, the infantile period is characterized by a transient elevation in the levels of the two gonadotropins shortly after birth [50,88–91]. This phenomenon, known as mini-puberty in humans, is the first of three activational periods that primes the HPG axis for puberty and adult fertility, setting in motion the growth of the first wave of ovarian follicles that will ovulate at puberty in females and the development of the testes in males [92]. Intriguingly, as shown by Leo Dunkel, the amplitude of minipuberty (attested by FSH levels) varies tremendously depending on gestational age at birth in both boys and girls, increasing up to 300-fold in preterm female infants [93]. In rodents, a similar transient FSH peak has been reported at ~12–14 days of postnatal life [52,94]. Intriguingly, at the same time (PN14), AMH is downregulated in preantral/early antral follicles of the first waves [80]. Using cultures of infantile mice ovaries, these authors have demonstrated the existence of a repressive action of FSH on AMH expression in preantral/early antral follicles of the first follicular waves. Since treatment of infantile ovaries in organotypic cultures with AMH decreases FSH-mediated expression of *Cyp19a1* aromatase, the authors hypothesized that the negative action of FSH on AMH expression is necessary to alleviate the inhibitory action of AMH on FSH-dependent E2 biosynthesis in these growing follicles [80].

Altogether, these studies shed new light on the role of AMH in the control of the hypothalamic-pituitary function and regulation of fertility in physiological conditions (**Figure 2**).

5. AMH relevance to polycystic ovary syndrome (PCOS)

5.1 Functional variation of AMH pathway in polycystic ovary syndrome (PCOS)

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a complex reproductive endocrine disorder, affecting more than 10% of women worldwide and representing the primary cause of anovulatory infertility [95]. Furthermore, PCOS predisposes patients to metabolic dysfunction, to an increased risk of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease [96,97].

A recent international guideline for the assessment and management of PCOS announced in 2018 [98] promotes the use of the Rotterdam diagnostic criteria [99]. These criteria require the presence of at least 2 of the following 3 features of PCOS: oligo-anovulation, hyperandrogenism and polycystic ovary morphology (PCOM) at ultrasound.

PCOS has been considered for a long time mainly as a gonadal pathology but more recently accumulating evidence has started to shed light on the neuroendocrine impairments associated with the pathophysiology of this syndrome [100]. In women with PCOS, AMH serum levels are found frequently to be 2-3-fold higher than in women with healthy ovaries [101,102]. Moreover, the severity of the PCOS phenotype correlates with AMH production, which is higher in anovulatory than in ovulatory PCOS patients [103–105]. Interestingly, circulating AMH levels have been found to be significantly higher also in naturally hyperandrogenic female rhesus monkeys, which exhibit traits typical of women with PCOS [106].

Clinically observed correlations between enhanced basal levels of AMH and PCOS have led to a well-developed physiological role for AMH in follicular development [107]. In this pathology, enhanced numbers of primary follicles secrete abnormally high levels of AMH which results in a diminished suppression of androgen production and secretion coupled to arrested follicular maturation.

In women with PCOS, a positive correlation between LH and AMH serum levels has been shown [108] independently from androgen and FSH levels [109]. In addition, several authors have shown that LH could stimulate AMH secretion and expression [103,110]. LH hypertonia is found in about 50% of women with PCOS, with a prevalence of up to 95% in metabolically healthy women with PCOS [111]. The high LH circulating levels reported in women with PCOS further exacerbate hyperandrogenism by stimulating thecal cell androgen production. The increase in LH frequency in these women could be attributed to a lack of negative feedback from progesterone as a result of hypothalamic prenatal androgenization ; [100,112].

The elevated LH pulse frequency is also suggestive of an acceleration of the GnRH pulse frequency [113,114]. Nevertheless, the origin of GnRH hypersecretion in women with PCOS is unknown, as it is unknown whether this alone could be sufficient to trigger the cascade of events leading to PCOS. As detailed above, a recent study by Cimino and colleagues have shown that in rodents AMH induces LH secretion by stimulating the activation of and neuropeptide secretion in GnRH neurons [19]. These results raise the innovative hypothesis that AMH, the circulating levels of which are abnormally elevated in PCOS patients with severe oligo-anovulation, might contribute significantly to the hormonal and gonadal alterations that are observed in women with PCOS and to impact on fertility by centrally affecting GnRH neuronal excitability prenatally and/or postnatally.

5.2 AMH and neuroendocrine origins of PCOS

Familial clustering and twin studies have shown that PCOS has a strong heritable component [115]. Polymorphisms in both *AMH* and *AMHR2* have been identified in women with PCOS [116–118]. However, the polymorphisms identified in the AMH signaling pathway and in other genes do not explain the frequency of the disease [119], suggesting that environmental and epigenetic mechanisms may play far greater roles in the onset of PCOS.

In women with PCOS, endocrine alterations, such as hormonal imbalances, during gestation may contribute to an increased risk that their offspring will develop PCOS [120]. Prenatal exposure to testosterone (DHT or T) have been reported to generate the closest PCOS-like phenotype in a variety of animal models [100]. This points to prenatal hyperandrogenism as one of the main triggers of the developmental programming of PCOS. Notably, two recent studies [81,121] showed that pregnant women with PCOS have significantly higher circulating AMH levels than pregnant women with normal fertility during the second trimester of gestation as well as at term. This two-fold greater AMH level compared with controls, add AMH to the list of potential candidates in the prenatal programming of PCOS. Piltonen and colleagues also reported novel data on the correlation between gestational AMH and androgen levels in humans in late pregnancy in a time window sensitive to trigger PCOS-like phenotype in offspring in animal models [121]. Moreover, recent data also suggest a possible role for AMH in transgenerational PCOS pathogenesis, as high gestational AMH levels in mice result in a hyperandrogenic PCOS-like phenotype in adult female offspring [81]; **Figure 3**).

Interestingly, prenatal AMH treatment leads to a significant three-fold T increase in the dams, which is likely responsible to rewire fetal hypothalamic circuits (**Figure 3**) to excessive excitatory inputs onto GnRH neurons and finally leading to the acquisition of neuroendocrine and reproductive defects in the offspring. However, whether T levels are also elevated in the amniotic liquid of the fetuses remain to be assessed. The AMH-dependent maternal androgenization is most likely the result of a dual action of AMH on the dams' physiology: (i) a central action exacerbating GnRH- and LH-driven ovarian steroidogenesis and (ii) an AMH-driven inhibition of aromatase expression in the placenta, leading to an increase in T bioavailability [81]. In humans, AMH has been shown to modify the enzymatic activity of steroid hormone synthesis [122], and women with PCOS have been reported to have reduced placental aromatase activity and increased steroidogenic activity [101], giving support to the findings of Giacobini group also in humans. Most women with PCOS are hyperandrogenic during pregnancy [120,123], yet the cause of this remains enigmatic. The work of Tata and colleagues raises the intriguing hypothesis as to whether the origin of the gestational hyperandrogenism of women with PCOS has to be found in elevated AMH levels during pregnancy and inhibition of aromatase expression/activity, even though it is not known yet whether a causal relationship between AMH and testosterone might exist during gestation in humans. Another important finding emerging from this study relates to the fact that the AMH-dependent prenatal hyperandrogenism leads to a persistent GnRH neuronal hyperactivity in the adult offspring (**Figure 3**). The novel proposal guiding this study is that PCOS could involve a brain-dysregulation and that deregulation of GnRH neuronal activity/secretion could be the basis for neuroendocrine anomalies that accompany the gonadal disturbances in the syndrome. Indeed, the prenatal co-treatment of AMH with a GnRH antagonist prevented the appearance of PCOS-like neuroendocrine traits in the offspring, suggesting a critical role for GnRH in the prenatal programming of the disease [81]. Even more strikingly, the same authors provided compelling evidence that intermittent delivery of a GnRH antagonist to adult prenatal AMH treated mice (PAMH), corrected their neuroendocrine and reproductive alterations. Given the fact that GnRH antagonists are frequently used in the clinic, pharmacological antagonism aimed at tempering GnRH–LH secretion is an attractive therapeutic strategy to restore ovulation and fertility in individuals with PCOS characterized by high LH levels.

6 Conclusion

Since its discovery, great strides have been made that have allowed us to form a good appreciation of the role of AMH in both male and female gonadal function and how dysregulated AMH signaling is involved in infertility syndromes. While we now have a much broader appreciation and insight into disorders such as PCOS thanks to this enormous amount of work, we are still no closer to understanding the true etiology of this syndrome, with genetic traits only partially able to sustain a fraction of clinical cases. The recent work building on the discovery of AMH receptors outside of the gonads and its potential to regulate both gonadotropic cells of the anterior pituitary as well as the hypothalamus has the potential for us to truly consider AMH as a neuroendocrine regulator of fertility. Much work is still to be done to elucidate the mode of action in the hypothalamus and the significance of its role in the pituitary but these novel sites of action provide new insights into the pathophysiology of reproductive dysfunction. This is especially relevant considering the proposed potential prenatal programming of PCOS by excessive maternal AMH, both for its ability to recapitulate a PCOS like phenotype in the offspring in mice as well as the potential clinical relevance, as AMH levels in PCOS mothers were recently shown to be elevated compared to controls.

Acknowledgements

The author (P.G.) is supported by: the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (ERC-2016-CoG to P.G. grant agreement n° 725149/REPRODAMH); the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), France (grant number U1172).

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- 1 Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, et al.: Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 1986;45:685–698.
- 2 Jost A. The age factor in the castration of male rabbit fetuses. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1947;66:302-303.
- 3 Jost A, Jost CA: Problems of fetal endocrinology: The gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog. Horm Res* 1953;8:379-418.
- 4 Picard JY, Benarous R, Guerrier D, Josso N, Kahn A: Cloning and expression of cDNA for anti-müllerian hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:5464–5468.
- 5 Münsterberg A, Lovell-Badge R: Expression of the mouse anti-müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Dev Camb Engl* 1991;113:613–624.
- 6 Haqq C, Lee MM, Tizard R, Wysk M, DeMarinis J, Donahoe PK, et al.: Isolation of the rat gene for Mullerian inhibiting substance. *Genomics* 1992;12:665–669.
- 7 Lahbib-Mansais Y, Barbosa A, Yerle M, Parma P, Milan D, Pailhoux E, et al.: Mapping in pig of genes involved in sexual differentiation: AMH, WT1, FTZF1, SOX2, SOX9, AHC, and placental and embryonic CYP19. *Cytogenet Cell Genet* 1997;76:109–114.
- 8 Pask AJ, Whitworth DJ, Mao C-A, Wei K-J, Sankovic N, Graves JAM, et al.: Marsupial anti-Mullerian hormone gene structure, regulatory elements, and expression. *Biol Reprod* 2004;70:160–167.
- 9 Oreal E, Pieau C, Mattei MG, Josso N, Picard JY, Carré-Eusèbe D, et al.: Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 1998;212:522–532.
- 10 Western PS, Harry JL, Graves JA, Sinclair AH: Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 1999;216:411–419.
- 11 Schulz RW, Bogerd J, Male R, Ball J, Fenske M, Olsen LC, et al.: Estrogen-induced alterations in amh and dmrt1 expression signal for disruption in male sexual development in the zebrafish. *Environ Sci Technol* 2007;41:6305–6310.
- 12 Al-Asaad I, Chardard D, di Clemente N, Picard J-Y, Dumond H, Chesnel A, et al.: Müllerian inhibiting substance in the caudate amphibian *Pleurodeles waltl*. *Endocrinology* 2013;154:3931–3936.
- 13 Gustafson ML, Lee MM, Asmundson L, MacLaughlin DT, Donahoe PK: Müllerian inhibiting substance in the diagnosis and management of intersex and gonadal abnormalities. *J Pediatr Surg* 1993;28:439–444.

- 14 Long WQ, Ranchin V, Pautier P, Belville C, Denizot P, Cailla H, et al.: Detection of minimal levels of serum anti-Müllerian hormone during follow-up of patients with ovarian granulosa cell tumor by means of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:540–544.
- 15 La Marca A, De Leo V, Giulini S, Orvieto R, Malmusi S, Giannella L, et al.: Anti-Müllerian hormone in premenopausal women and after spontaneous or surgically induced menopause. *J Soc Gynecol Investig* 2005;12:545–548.
- 16 Wang P-Y, Koishi K, McGeachie AB, Kimber M, Maclaughlin DT, Donahoe PK, et al.: Müllerian inhibiting substance acts as a motor neuron survival factor in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:16421–16425.
- 17 Wang P-Y, Protheroe A, Clarkson AN, Imhoff F, Koishi K, McLennan IS: Müllerian inhibiting substance contributes to sex-linked biases in the brain and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:7203–7208.
- 18 Lebeurrier N, Launay S, Macrez R, Maubert E, Legros H, Leclerc A, et al.: Anti-Müllerian-hormone-dependent regulation of the brain serine-protease inhibitor neuroserpin. *J Cell Sci* 2008;121:3357–3365.
- 19 Cimino I, Casoni F, Liu X, Messina A, Parkash J, Jamin SP, et al.: Novel role for anti-Müllerian hormone in the regulation of GnRH neuron excitability and hormone secretion. *Nat Commun* 2016;7:10055.
- 20 Garrel G, Racine C, L'Hôte D, Denoyelle C, Guigon CJ, di Clemente N, et al.: Anti-Müllerian hormone: a new actor of sexual dimorphism in pituitary gonadotrope activity before puberty. *Sci Rep* 2016;6:23790.
- 21 Picard JY, Josso N: Anti-Müllerian hormone: estimation of molecular weight by gel filtration. *Biomed Publiee Pour AAICIG* 1976;25:147–150.
- 22 Picard JY, Josso N: Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. *Mol Cell Endocrinol* 1984;34:23–29.
- 23 di Clemente N, Ghaffari S, Pepinsky RB, Pieau C, Josso N, Cate RL, et al.: A quantitative and interspecific test for biological activity of anti-müllerian hormone: the fetal ovary aromatase assay. *Dev Camb Engl* 1992;114:721–727.
- 24 di Clemente N, Jamin SP, Lugovskoy A, Carmillo P, Ehrenfels C, Picard J-Y, et al.: Processing of anti-müllerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF-beta. *Mol Endocrinol Baltim Md* 2010;24:2193–2206.
- 25 Pankhurst MW, McLennan IS: Human blood contains both the uncleaved precursor of anti-Müllerian hormone and a complex of the NH₂- and COOH-terminal peptides. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E1241-1247.

- 26 MacLaughlin DT, Hudson PL, Graciano AL, Kenneally MK, Ragin RC, Manganaro TF, et al.: Mullerian duct regression and antiproliferative bioactivities of mullerian inhibiting substance reside in its carboxy-terminal domain. *Endocrinology* 1992;131:291–296.
- 27 Pankhurst MW, McLennan IS: Human blood contains both the uncleaved precursor of anti-Mullerian hormone and a complex of the NH₂- and COOH-terminal peptides. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E1241-7.
- 28 Wilson CA, di Clemente N, Ehrenfels C, Pepinsky RB, Josso N, Vigier B, et al.: Mullerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Endocrinol Baltim Md* 1993;7:247–257.
- 29 Pepinsky RB, Sinclair LK, Chow EP, Mattaliano RJ, Manganaro TF, Donahoe PK, et al.: Proteolytic processing of mullerian inhibiting substance produces a transforming growth factor-beta-like fragment. *J Biol Chem* 1988;263:18961–18964.
- 30 Nachtigal MW, Ingraham HA: Bioactivation of Müllerian inhibiting substance during gonadal development by a *kex2*/subtilisin-like endoprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7711–7716.
- 31 Cain BM, Connolly K, Blum A, Vishnuvardhan D, Marchand JE, Beinfeld MC, et al.: Distribution and colocalization of cholecystokinin with the prohormone convertase enzymes PC1, PC2, and PC5 in rat brain. *J Comp Neurol* 2003;467:307–325.
- 32 Mishina Y, Rey R, Finegold MJ, Matzuk MM, Josso N, Cate RL, et al.: Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes Dev* 1996;10:2577–2587.
- 33 Baarends WM, van Helmond MJ, Post M, van der Schoot PJ, Hoogerbrugge JW, de Winter JP, et al.: A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the müllerian duct. *Dev Camb Engl* 1994;120:189–197.
- 34 di Clemente N, Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, Tizard R, et al.: Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. *Mol Endocrinol Baltim Md* 1994;8:1006–1020.
- 35 Josso N, Clemente N di: Transduction pathway of anti-Müllerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family. *Trends Endocrinol Metab TEM* 2003;14:91–97.
- 36 Shi Y, Massagué J: Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685–700.
- 37 Rooij IAJ Van, Broekmans FJM, Velde ER, Fauser BCJM, Bancsi LFJMM, Jong FH De, et al.: Serum anti-Mulerian hormone levels : a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod Oxf Engl* 2002;17:3065–3071.
- 38 Peñarrubia J, Fábregues F, Manau D, Creus M, Casals G, Casamitjana R, et al.: Basal and stimulation day 5 anti-Mullerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian

- response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist--gonadotropin treatment. *Hum Reprod Oxf Engl* 2005;20:915–22.
- 39 Grynnerup AG-A, Lindhard A, Sørensen S: The role of anti-Müllerian hormone in female fertility and infertility - an overview. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2012;91:1252–60.
- 40 La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Arsenio A C, et al.: Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update* 2010;16:113–30.
- 41 Dewailly D, Gronier H, Poncelet E, Robin G, Leroy M, Pigny P, et al.: Diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. *Hum Reprod Oxf Engl* 2011;26:3123–3129.
- 42 Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, et al.: The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Hum Reprod Update* 2014;20:370–385.
- 43 La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Arsenio AC, et al.: Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update* 2010;16:113–130.
- 44 Durlinger ALL, Visser JA, Themmen APN: Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reprod Camb Engl* 2002;124:601–609.
- 45 Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen APN, Hovatta O: Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum Reprod Oxf Engl* 2006;21:2223–2227.
- 46 Durlinger ALL, Kramer P, Karels BAS, Jong FHDE, Uilenbroek JANTHJ, Grootegoed JA, et al.: Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian Hormone in the Mouse Ovary. *Endocrinology* 1999;140:5789–5796.
- 47 Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen AP, et al.: Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* 1995;136:4951–4962.
- 48 Mazaud S, Guigon CJ, Lozach A, Coudouel N, Forest MG, Coffigny H, et al.: Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal gamma-irradiation. *Endocrinology* 2002;143:4775–4787.
- 49 Hagen CP, Aksglaede L, Sørensen K, Main KM, Boas M, Cleemann L, et al.: Serum levels of anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian function in 926 healthy females from birth to adulthood and in 172 Turner syndrome patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:5003–5010.

- 50 Kuiri-Hänninen T, Kallio S, Seuri R, Tyrväinen E, Liakka A, Tapanainen J, et al.: Postnatal developmental changes in the pituitary-ovarian axis in preterm and term infant girls. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:3432–3439.
- 51 Torres-Rovira L, Succu S, Pasciu V, Manca ME, Gonzalez-Bulnes A, Leoni GG, et al.: Postnatal pituitary and follicular activation: a revisited hypothesis in a sheep model. *Reprod Camb Engl* 2016;151:215–225.
- 52 François CM, Petit F, Giton F, Gougeon A, Ravel C, Magre S, et al.: A novel action of follicle-stimulating hormone in the ovary promotes estradiol production without inducing excessive follicular growth before puberty. *Sci Rep* 2017;7:46222.
- 53 Durlinger a L, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, et al.: Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001;142:4891–9.
- 54 Depmann M, van Disseldorp J, Broer SL, Eijkemans MJC, Laven JSE, Visser JA, et al.: Fluctuations in anti-Müllerian hormone levels throughout the menstrual cycle parallel fluctuations in the antral follicle count: a cohort study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2016;95:820–828.
- 55 Grossman MP, Nakajima ST, Fallat ME, Siow Y: Müllerian-inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture. *Fertil Steril* 2008;89:1364–1370.
- 56 Chang H-M, Klausen C, Leung PCK: Antimüllerian hormone inhibits follicle-stimulating hormone-induced adenylyl cyclase activation, aromatase expression, and estradiol production in human granulosa-lutein cells. *Fertil Steril* 2013;100:585-592.e1.
- 57 Andersen CY, Byskov AG: Estradiol and regulation of anti-Müllerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4064–4069.
- 58 Dumesic DA, Lesnick TG, Stassart JP, Ball GD, Wong A, Abbott DH: Intrafollicular antimüllerian hormone levels predict follicle responsiveness to follicle-stimulating hormone (FSH) in normoandrogenic ovulatory women undergoing gonadotropin releasing-hormone analog/recombinant human FSH therapy for in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 2009;92:217–221.
- 59 Tran D, Muesy-Dessole N, Josso N: Anti-Müllerian hormone is a functional marker of foetal Sertoli cells. *Nature* 1977;269:411–412.
- 60 Mamsen LS, Ernst EH, Borup R, Larsen A, Olesen RH, Ernst E, et al.: Temporal expression pattern of genes during the period of sex differentiation in human embryonic gonads. *Sci Rep* 2017;7:15961.
- 61 Lee MM, Seah CC, Masiakos PT, Sottas CM, Preffer FI, Donahoe PK, et al.: Müllerian-inhibiting substance type II receptor expression and function in purified rat Leydig cells. *Endocrinology* 1999;140:2819–2827.

- 62 Racine C, Rey R, Forest MG, Louis F, Ferré A, Huhtaniemi I, et al.: Receptors for anti-müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:594–599.
- 63 Trbovich AM, Sluss PM, Laurich VM, O’Neill FH, MacLaughlin DT, Donahoe PK, et al.: Müllerian Inhibiting Substance lowers testosterone in luteinizing hormone-stimulated rodents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3393–3397.
- 64 Weintraub A, Eldar-Geva T: Anti-Müllerian Hormone (AMH) Determinations in the Pediatric and Adolescent Endocrine Practice. *Pediatr Endocrinol Rev PER* 2017;14:364–370.
- 65 Rey R: Anti-Müllerian hormone in disorders of sex determination and differentiation. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2005;49:26–36.
- 66 Chemes HE, Rey RA, Nistal M, Regadera J, Musse M, González-Peramato P, et al.: Physiological androgen insensitivity of the fetal, neonatal, and early infantile testis is explained by the ontogeny of the androgen receptor expression in Sertoli cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4408–4412.
- 67 Boukari K, Meduri G, Brailly-Tabard S, Guibourdenche J, Ciampi ML, Massin N, et al.: Lack of androgen receptor expression in Sertoli cells accounts for the absence of anti-Müllerian hormone repression during early human testis development. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1818–1825.
- 68 Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL: Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 1994;79:415–425.
- 69 Fallat ME, Siow Y, Belker AM, Boyd JK, Yoffe S, MacLaughlin DT: The presence of müllerian inhibiting substance in human seminal plasma. *Hum Reprod Oxf Engl* 1996;11:2165–2169.
- 70 Fénichel P, Rey R, Poggioli S, Donzeau M, Chevallier D, Pointis G: Anti-Müllerian hormone as a seminal marker for spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod Oxf Engl* 1999;14:2020–2024.
- 71 Tüttelmann F, Dykstra N, Themmen APN, Visser JA, Nieschlag E, Simoni M: Anti-Müllerian hormone in men with normal and reduced sperm concentration and men with maldescended testes. *Fertil Steril* 2009;91:1812–1819.
- 72 Siow Y, Fallat ME, Amin FA, Belker AM: Müllerian inhibiting substance improves longevity of motility and viability of fresh and cryopreserved sperm. *J Androl* 1998;19:568–572.
- 73 Herbison AE, Simonian SX, Norris PJ, Emson PC: Relationship of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity to GnRH neurons in the ovariectomized and intact female rat. *J Neuroendocrinol* 1996;8:73–82.
- 74 d’Anglemont de Tassigny X, Campagne C, Dehouck B, Leroy D, Holstein GR, Beauvillain J-C, et al.: Coupling of neuronal nitric oxide synthase to NMDA receptors via

- postsynaptic density-95 depends on estrogen and contributes to the central control of adult female reproduction. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2007;27:6103–6114.
- 75 Hanchate NK, Parkash J, Bellefontaine N, Mazur D, Colledge WH, d'Anglemont de Tassigny X, et al.: Kisspeptin-GPR54 signaling in mouse NO-synthesizing neurons participates in the hypothalamic control of ovulation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2012;32:932–945.
- 76 Clasadonte J, Poulain P, Beauvillain J-C, Prevot V: Activation of neuronal nitric oxide release inhibits spontaneous firing in adult gonadotropin-releasing hormone neurons: a possible local synchronizing signal. *Endocrinology* 2008;149:587–596.
- 77 Bellefontaine N, Chachlaki K, Parkash J, Vanacker C, Colledge W, d'Anglemont de Tassigny X, et al.: Leptin-dependent neuronal NO signaling in the preoptic hypothalamus facilitates reproduction. *J Clin Invest* 2014;124:2550–2559.
- 78 Chachlaki K, Garthwaite J, Prevot V: The gentle art of saying NO: how nitric oxide gets things done in the hypothalamus. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13:521–535.
- 79 Prevot V, Dehouck B, Sharif A, Ciofi P, Giacobini P, Clasadonte J: The Versatile Tanyocyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. *Endocr Rev* 2018;39:333–368.
- 80 Devillers M, Petit F, Cluzet V, François CM, Giton F, Garrel G, et al.: FSH inhibits AMH to support ovarian estradiol synthesis in infantile mice. *J Endocrinol* 2018; DOI: 10.1530/JOE-18-0313
- 81 Tata B, Mimouni NEH, Barbotin A-L, Malone SA, Loyens A, Pigny P, et al.: Elevated prenatal anti-Müllerian hormone reprograms the fetus and induces polycystic ovary syndrome in adulthood. *Nat Med* 2018;24:834–846.
- 82 Ragin RC, Donahoe PK, Kenneally MK, Ahmad MF, MacLaughlin DT: Human müllerian inhibiting substance: enhanced purification imparts biochemical stability and restores antiproliferative effects. *Protein Expr Purif* 1992;3:236–245.
- 83 Pankhurst MW, Chong YH, McLennan IS: Relative levels of the proprotein and cleavage-activated form of circulating human anti-Müllerian hormone are sexually dimorphic and variable during the life cycle. *Physiol Rep* 2016;4. DOI: 10.14814/phy2.12783
- 84 Herde MK, Geist K, Campbell RE, Herbison AE: Gonadotropin-releasing hormone neurons extend complex highly branched dendritic trees outside the blood-brain barrier. *Endocrinology* 2011;152:3832–3841.
- 85 Schaeffer M, Langlet F, Lafont C, Molino F, Hodson DJ, Roux T, et al.: Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:1512–1517.
- 86 Bédécarrats GY, O'Neill FH, Norwitz ER, Kaiser UB, Teixeira J: Regulation of gonadotropin gene expression by Müllerian inhibiting substance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9348–9353.

- 87 Garrel G, Denoyelle C, L'Hôte D, Picard J-Y, Teixeira J, Kaiser UB, et al.: GnRH Transactivates Human AMH Receptor Gene via Egr1 and FOXO1 in Gonadotrope Cells. *Neuroendocrinology* 2019;108:65–83.
- 88 Döhler KD, Wuttke W: Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology* 1975;97:898–907.
- 89 Dullaart J, Kent J, Ryle M: Serum gonadotrophin concentrations in infantile female mice. *J Reprod Fertil* 1975;43:189–192.
- 90 Winter JS, Hughes IA, Reyes FI, Faiman C: Pituitary-gonadal relations in infancy: 2. Patterns of serum gonadal steroid concentrations in man from birth to two years of age. *J Clin Endocrinol Metab* 1976;42:679–686.
- 91 Chellakooty M, Schmidt IM, Haavisto AM, Boisen KA, Damgaard IN, Mau C, et al.: Inhibin A, inhibin B, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and sex hormone-binding globulin levels in 473 healthy infant girls. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3515–3520.
- 92 Prevot, Vincent: Puberty in mice and rats; in : Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, eds. Plant, T.M. & Zeleznik, J. New-York, Elsevier, 2015, p pp 1395-1439.
- 93 Kuiri-Hänninen T, Sankilampi U, Dunkel L: Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy: minipuberty. *Horm Res Paediatr* 2014;82:73–80.
- 94 Messina A, Langlet F, Chachlaki K, Roa J, Rasika S, Jouy N, et al.: A microRNA switch regulates the rise in hypothalamic GnRH production before puberty. *Nat Neurosci* 2016;19:835–844.
- 95 Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO: The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2745–2749.
- 96 Dumesic DA, Oberfield SE, Stener-Victorin E, Marshall JC, Laven JS, Legro RS: Scientific Statement on the Diagnostic Criteria, Epidemiology, Pathophysiology, and Molecular Genetics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocr Rev* 2015;36:487–525.
- 97 Escobar-Morreale HF: Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2018;14:270–284.
- 98 Teede HJ, Misso ML, Costello MF, Dokras A, Laven J, Moran L, et al.: Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Oxf Engl* 2018;33:1602–1618.
- 99 Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group: Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod Oxf Engl* 2004;19:41–47.

- 100 Walters KA, Gilchrist RB, Ledger WL, Teede HJ, Handelsman DJ, Campbell RE: New Perspectives on the Pathogenesis of PCOS: Neuroendocrine Origins. *Trends Endocrinol Metab* 2018;29:841–852.
- 101 Cook CL, Siow Y, Brenner AG, Fallat ME: Relationship between serum müllerian-inhibiting substance and other reproductive hormones in untreated women with polycystic ovary syndrome and normal women. *Fertil Steril* 2002;77:141–146.
- 102 Pigny P, Jonard S, Robert Y, Dewailly D: Serum anti-Müllerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:941–945.
- 103 Pellatt L, Hanna L, Brincat M, Galea R, Brain H, Whitehead S, et al.: Granulosa cell production of anti-Müllerian hormone is increased in polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:240–245.
- 104 Pellatt L, Rice S, Mason HD: Anti-Müllerian hormone and polycystic ovary syndrome: a mountain too high? *Reprod Camb Engl* 2010;139:825–833.
- 105 Catteau-Jonard S, Bancquart J, Poncelet E, Lefebvre-Maunoury C, Robin G, Dewailly D: Polycystic ovaries at ultrasound: normal variant or silent polycystic ovary syndrome? *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol* 2012;40:223–229.
- 106 Abbott DH, Rayome BH, Dumesic DA, Lewis KC, Edwards AK, Wallen K, et al.: Clustering of PCOS-like traits in naturally hyperandrogenic female rhesus monkeys. *Hum Reprod Oxf Engl* 2017;32:923–936.
- 107 Catteau-Jonard S, Dewailly D: Anti-Müllerian hormone and polycystic ovary syndrome. *Gynécologie Obstétrique Fertil* 2011;39:514–7.
- 108 Laven JSE, Mulders AGMGJ, Visser JA, Themmen AP, De Jong FH, Fauser BCJM: Anti-Müllerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:318–323.
- 109 Catteau-Jonard S, Pigny P, Reyss A-C, Decanter C, Poncelet E, Dewailly D: Changes in serum anti-müllerian hormone level during low-dose recombinant follicular-stimulating hormone therapy for anovulation in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4138–4143.
- 110 Taieb J, Grynberg M, Pierre A, Arouche N, Massart P, Belville C, et al.: FSH and its second messenger cAMP stimulate the transcription of human anti-Müllerian hormone in cultured granulosa cells. *Mol Endocrinol Baltim Md* 2011;25:645–655.
- 111 Huang C-C, Tien Y-J, Chen M-J, Chen C-H, Ho H-N, Yang Y-S: Symptom patterns and phenotypic subgrouping of women with polycystic ovary syndrome: association between endocrine characteristics and metabolic aberrations. *Hum Reprod Oxf Engl* 2015;30:937–946.
- 112 Burt Solorzano CM, Beller JP, Abshire MY, Collins JS, McCartney CR, Marshall JC: Neuroendocrine dysfunction in polycystic ovary syndrome. *Steroids* 2012;77:332–337.

- 113 Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R: Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:219–231.
- 114 Ehrmann DA: Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2005;352:1223–1236.
- 115 McAllister JM, Legro RS, Modi BP, Strauss JF: Functional genomics of PCOS: from GWAS to molecular mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* 2015;26:118–124.
- 116 Georgopoulos NA, Karagiannidou E, Koika V, Roupas ND, Armeni A, Marioli D, et al.: Increased frequency of the anti-müllerian-inhibiting hormone receptor 2 (AMHR2) 482 A>G polymorphism in women with polycystic ovary syndrome: relationship to luteinizing hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E1866-1870.
- 117 Gorsic LK, Kosova G, Werstein B, Sisk R, Legro RS, Hayes MG, et al.: Pathogenic Anti-Müllerian Hormone Variants in Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;102:2862–2872.
- 118 Gorsic LK, Dapas M, Legro RS, Hayes MG, Urbanek M: Functional Genetic Variation in the Anti-Müllerian Hormone Pathway in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2019; DOI: 10.1210/jc.2018-02178
- 119 Azziz R, Carmina E, Chen Z, Dunaif A, Laven JSE, Legro RS, et al.: Polycystic ovary syndrome. *Nat Rev Dis Primer* 2016;2:16057.
- 120 Sir-Petermann T, Maliqueo M, Codner E, Echiburú B, Crisosto N, Pérez V, et al.: Early metabolic derangements in daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4637–4642.
- 121 Piltonen TT, Giacobini P, Edvinsson Å, Hustad S, Lager S, Morin-Papunen L, et al.: Circulating antimüllerian hormone and steroid hormone levels remain high in pregnant women with polycystic ovary syndrome at term. *Fertil Steril* 2019;111:588-596.e1.
- 122 Maliqueo M, Lara HE, Sánchez F, Echiburú B, Crisosto N, Sir-Petermann T: Placental steroidogenesis in pregnant women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;166:151–155.
- 123 Sir-Petermann T, Maliqueo M, Angel B, Lara HE, Pérez-Bravo F, Recabarren SE: Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovarian syndrome: possible implications in prenatal androgenization. *Hum Reprod Oxf Engl* 2002;17:2573–2579.

Figures

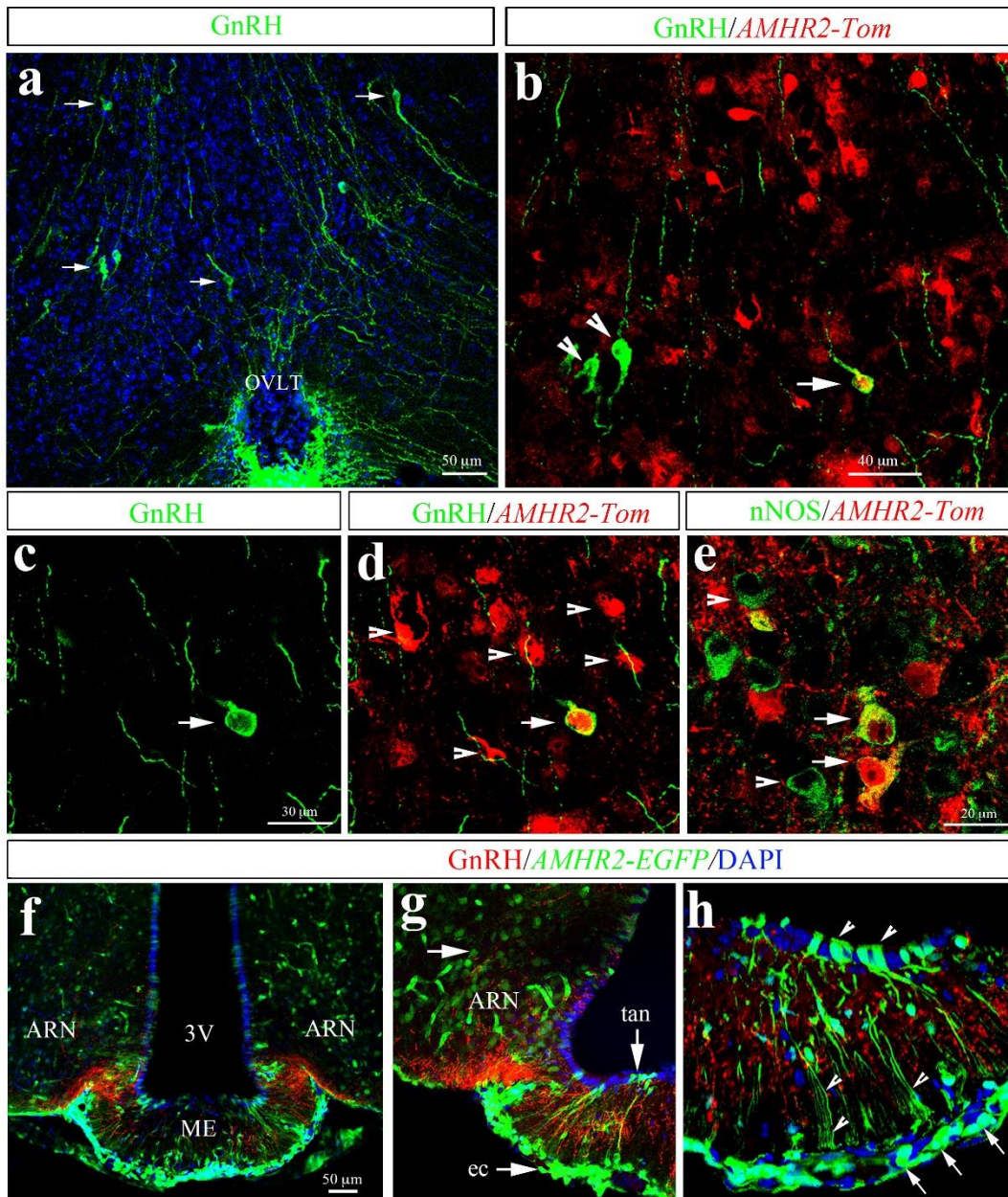


Figure 1 AMHR2 expression in adult mouse hypothalamic cell populations controlling fertility. (a-h) Representative coronal sections immunolabelled for GnRH, Tomato and GFP. (a) GnRH-immunoreactivity at the level of the organum vasculosum laminae terminalis (OVLT). Arrows indicate GnRH cell bodies. (b-d) AMHR2 expression in *AMHR2::Cre^{+/-};tdTomato^{loxP/+}* OVLT sections. AMHR2 is widely expressed in this region. A subpopulation of GnRH neurons (nearly 50%) express Tomato (arrows). Arrowheads point to GnRH cell bodies, which are AMHR2-negative. (e) Several nNOS-expressing neurons located in the OVLT express AMHR2 (arrows). (f-h) AMHR2 expression was also analysed in *AMHR2::Cre^{+/-};LacZ/EGFP* reporter mouse line. AMHR2 was found in the arcuate nucleus (ARN) and in the median eminence (me), where GnRH terminals project (red staining). AMHR2-expressing cells were found in hypothalamic tanycytes (tan; h, arrowheads) lining the third ventricle (3V) and endothelial cells (ec; h, arrows). See also [19].

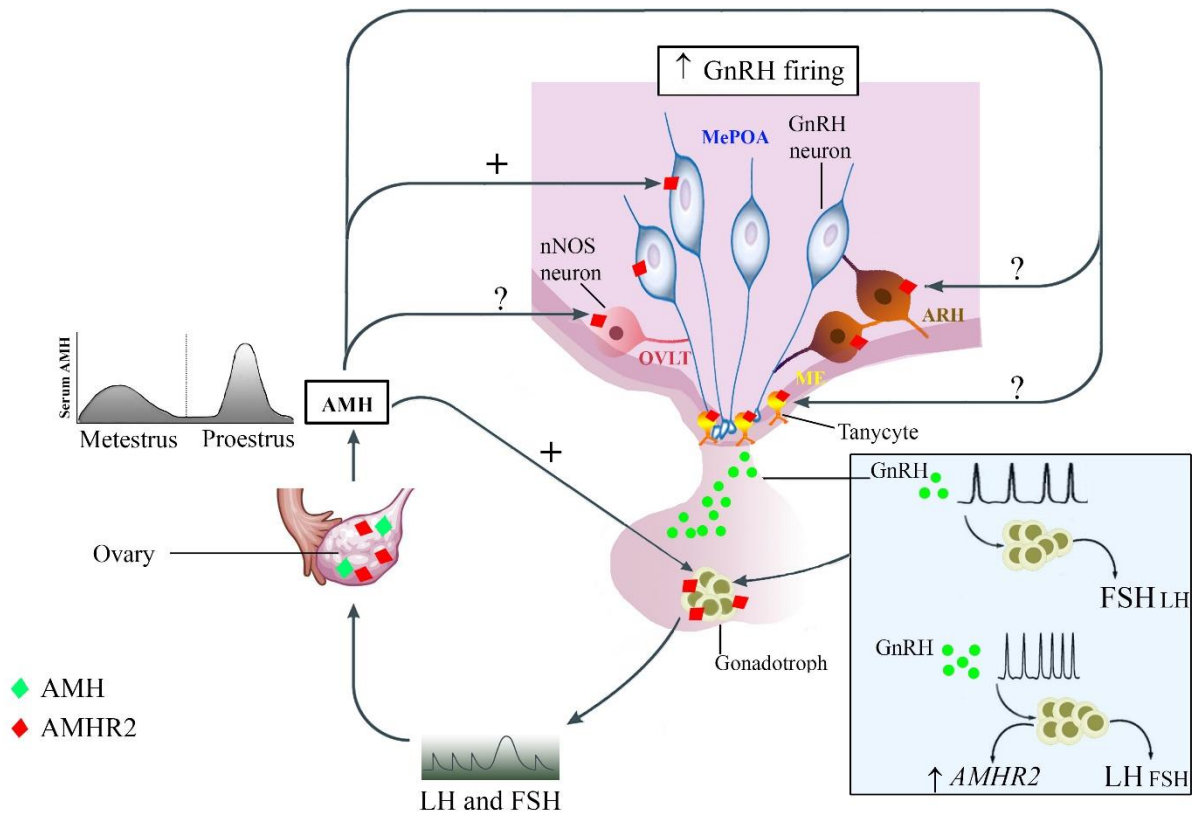


Figure 2 Expression and functions of AMH in rodents along the female hypothalamic-pituitary-gonadal axis. AMH is expressed in the ovaries, from the infantile period until adulthood (see [44,47–52]). AMH levels in mice have been shown to fluctuate during the estrous cycle with mean values significantly greater in proestrus and estrus as compared to diestrus [80].

AMHR2 is broadly expressed in different brain areas and cell-types involved in the central control of reproduction, including the organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) of the hypothalamus and the median eminence (ME) [19]. GnRH neurons also express AMHR2 and respond to AMH by increasing their neuronal activity and GnRH secretion. *AMHR2* transcripts and protein were found in rodent pituitaries [20,86]. Peripheral AMH may target the hypothalamus and the pituitary [19,20] increase LH and FSH levels, thereby leading to increased ovarian activity (see text for more explanations).

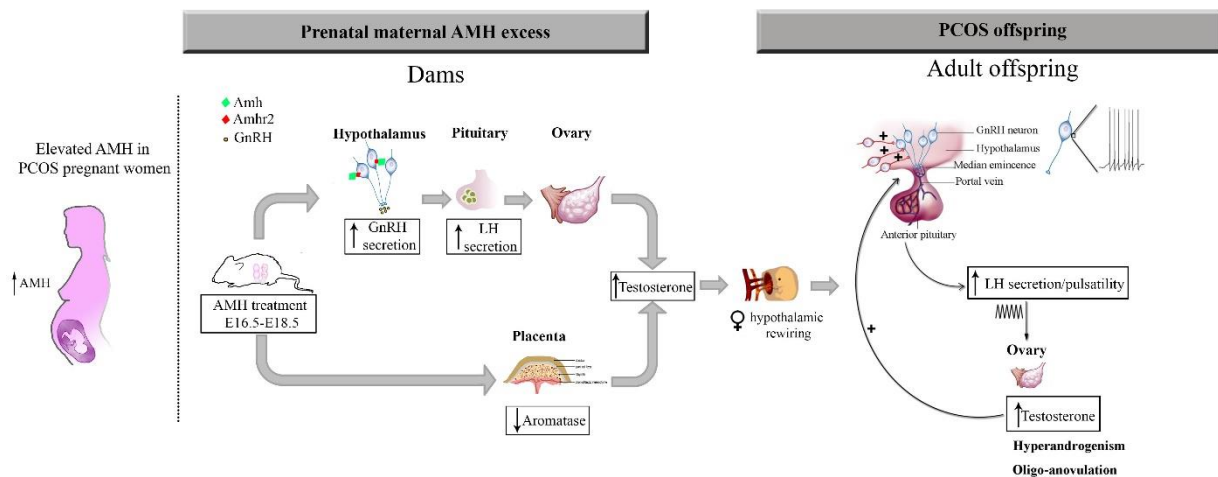


Figure 3 AMH prenatal reprogramming of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Potential prenatal and postnatal mechanisms. Pregnant women with PCOS have a two-fold increase in circulating AMH levels compared to pregnant women with normal fertility during the second trimester of gestation as well as at term [81,121]. In mice, prenatal exposure to elevated AMH levels leads to increased GnRH/LH pulsatility in dams, driving gestational steroidogenesis and hyperandrogenism. The maternal LH excess (driven by AMH action at the maternal hypothalamus) alone or in combination with AMH, engages placental deficits by inhibition of aromatase expression. This leads to an increase in testosterone bioavailability. The elevated levels of T trigger a cascade of events in the offspring, which converge into altered hypothalamic wiring. In adult female PCOS offspring, the increase in excitatory input to GnRH drives a persistent rise in the GnRH neuronal firing activity. Finally, the constitutive hyperactivity of GnRH neurons stimulates ovarian androgen production and impairs folliculogenesis and ovulation, contributing to the vicious circle of PCOS. See also [81].

Elevated prenatal anti-Müllerian hormone reprograms the fetus and induces polycystic ovary syndrome in adulthood

Brooke Tata^{1,2,9}, Nour El Houda Mimouni^{1,2,9}, Anne-Laure Barbotin^{1,3}, Samuel A. Malone^{1,2}, Anne Loyens^{1,2}, Pascal Pigny^{2,4}, Didier Dewailly^{1,2,5}, Sophie Catteau-Jonard^{1,2,5}, Inger Sundström-Poromaa⁶, Terhi T. Piltonen⁷, Federica Dal Bello⁸, Claudio Medana⁸, Vincent Prevot^{1,2}, Jerome Clasadonte^{1,2,10} and Paolo Giacobini^{1,2,10*}

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the main cause of female infertility worldwide and corresponds with a high degree of comorbidities and economic burden. How PCOS is passed on from one generation to the next is not clear, but it may be a developmental condition. Most women with PCOS exhibit higher levels of circulating luteinizing hormone, suggestive of heightened gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release, and anti-Müllerian hormone (AMH) as compared to healthy women. Excess AMH in utero may affect the development of the female fetus. However, as AMH levels drop during pregnancy in women with normal fertility, it was unclear whether their levels were also elevated in pregnant women with PCOS. Here we measured AMH in a cohort of pregnant women with PCOS and control pregnant women and found that AMH is significantly more elevated in the former group versus the latter. To determine whether the elevation of AMH during pregnancy in women with PCOS is a bystander effect or a driver of the condition in the offspring, we modeled our clinical findings by treating pregnant mice with AMH and followed the neuroendocrine phenotype of their female progeny postnatally. This treatment resulted in maternal neuroendocrine-driven testosterone excess and diminished placental metabolism of testosterone to estradiol, resulting in a masculinization of the exposed female fetus and a PCOS-like reproductive and neuroendocrine phenotype in adulthood. We found that the affected females had persistently hyperactivated GnRH neurons and that GnRH antagonist treatment in the adult female offspring restored their neuroendocrine phenotype to a normal state. These findings highlight a critical role for excess prenatal AMH exposure and subsequent aberrant GnRH receptor signaling in the neuroendocrine dysfunctions of PCOS, while offering a new potential therapeutic avenue to treat the condition during adulthood.

PCOS is the most common female reproductive disorder, affecting 10–18% of women of reproductive age worldwide^{1–4}. The syndrome is underpinned by excessive ovarian and/or adrenal androgen secretion, oligo-anovulation and, in many cases, insulin resistance and associated metabolic derangements^{2,5,6}. In nonpregnant women with PCOS, serum levels of AMH are two- to threefold higher than in women without polycystic ovaries or PCOS^{7,8}, and the severity of the reproductive dysfunction is positively correlated with AMH levels^{9,10}. The pathophysiology of PCOS also extends to hypothalamic neuronal dysregulation, as most PCOS individuals exhibit increased luteinizing hormone (LH) levels suggestive of high-frequency GnRH secretion^{2,11,12}. Whether this defect is primary or secondary to other changes in PCOS remains unclear, but recent evidence has shown that GnRH-positive neurons express AMH receptors and that exogenous AMH potently increases GnRH neuron firing and GnRH release in murine living tissue explants¹¹.

Familial clustering and twin studies have shown that PCOS has a strong heritable component¹³. However, the mutations that have

been identified so far do not account for its high prevalence in the population, implying that fetal environmental factors might play important roles in the onset of this disease¹⁴.

Here we showed that AMH concentrations during pregnancy are significantly higher in women with PCOS as compared to women with no reproductive defects (unpaired two-tailed Mann-Whitney *U* test, $P \leq 0.0001$). Using mouse models, we showed that exposure to excess AMH during gestation engaged a series of events in the dams leading to a fetal programming of the exposed offspring into exhibiting a PCOS-like reproductive and neuroendocrine phenotype in adulthood. GnRH antagonist treatment of these offspring during adulthood normalized their neuroendocrine phenotype.

Results

AMH levels during pregnancy are higher in women with PCOS than in controls. AMH levels were previously found to be low during pregnancy in women with normal fertility^{15,16}; however, whether this is also the case for pregnant women with PCOS has never

¹Jean-Pierre Aubert Research Center (JPARC), Laboratory of Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, Inserm UMR-S 1172, Lille, France.

²University of Lille, FHU 1000 Days for Health, Lille, France. ³CHU Lille, Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS, Lille, France. ⁴CHU Lille, Laboratoire de Biochimie & Hormonologie, Centre de Biologie Pathologie, Lille, France. ⁵CHU Lille, Service de Gynécologie Endocrinienne et Médecine de la Reproduction, Hôpital Jeanne de Flandre, Lille, France. ⁶Department of Women's and Children's Health, Uppsala University, Uppsala, Sweden.

⁷Department of Obstetrics and Gynecology, Oulu University Hospital, Oulu, Finland; University of Oulu and Medical Research Center Oulu, Oulu, Finland.

⁸Department of Molecular Biotechnology and Health Science, University of Torino, Torino, Italy. ⁹These authors contributed equally: Brooke Tata, Nour El Houda Mimouni. ¹⁰These authors jointly supervised this work: Jerome Clasadonte, Paolo Giacobini. *e-mail: paolo.giacobini@inserm.fr