

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
U.F.R. DE BIOLOGIE**

Ecole Doctorale de Biologie – Santé

Numéro d'ordre : 3032

THESE

**Présentée à l'Université de Lille I
Pour l'obtention du grade de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE EN SCIENCES DE LA VIE
ET DE LA SANTE**

Options : Neurosciences

Par

Claude KNAUF

**MISE EN EVIDENCE D'UNE LIBERATION SPONTANEE, PULSATILE ET
CYCLIQUE DE MONOXYDE D'AZOTE (NO) PAR L'EMINENCE MEDIANE AU
COURS DU CYCLE GESTRAL.
IMPLICATION DES CAPILLAIRES DU PLEXUS PORTE HYPOTHALAMO-
HYPOPHYSAIRE DANS LA LIBERATION DE LA GnRH.**

Soutenue le 14 décembre 2001, devant le jury composé de :

**Rapporteurs : Madame le Professeur Simone PARVEZ
Monsieur le Professeur Gérard TRAMU**

**Examineurs : Monsieur le Docteur Jean-Claude BEAUVILLAIN
Monsieur le Professeur Jean-Paul DUPOUY
Monsieur le Docteur Claude LEGRELE**

Directeur de thèse : Madame le Docteur Dominique CROIX

*A mes parents,
A Afi, Sarah et Thomas,
Aux familles Knauf et Ruiz,
A tous mes amis,*

A la mémoire d'Aurélio Ruiz



Madame le Professeur Simone PARVEZ,

Vos enseignements à l'Université de Reims ont influencé mes orientations professionnelles et m'ont amené logiquement vers la recherche. Veuillez trouver ici l'expression de mes sentiments respectueux.

Monsieur le Professeur Gérard TRAMU,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail en profondeur. C'est un honneur pour moi de vous compter parmi les membres du jury.

Monsieur le Professeur Jean-Paul DUPOUY,

Je vous suis reconnaissant d'avoir accepté de présider ce jury, et je vous remercie sincèrement de vous intéresser à mes travaux.

Monsieur le Docteur Claude LEGRELE,

Vous avez observé mes premiers pas à l'Université, et m'avez transmis votre passion pour la Physiologie et les Neurosciences. Je suis donc particulièrement honoré de vous compter parmi mes juges.

Monsieur le Docteur Jean-Claude BEAUVILLAIN,

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire et de m'avoir donné les moyens de réaliser ce travail. Merci également pour vos conseils et pour le temps précieux que vous m'avez consacré.

Madame le Docteur Dominique CROIX,

Je vous suis reconnaissant de m'avoir encadré pendant toutes ces années de recherche. Notre travail « NOergique » fut relativement difficile à mettre en place, et je vous remercie de la confiance dont vous avez fait part à mon égard tout au long de ces années. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie également :

Stéphanie Ferreira, Malika Hamdane et Christel Mailliot pour leur aide, encouragement, gentillesse... la liste est longue et je vous dois énormément.

Myriam Mariot-Tran Van Chuoi pour sa gentillesse à mon égard, et bien sûr, pour son aide considérable.

Geneviève « Gégé » Mortreux pour sa disponibilité.

Rebecca Bogaert pour son soutien et pour m'avoir fait rire pendant trois ans.

Anne-Véronique Sambo pour sa bonne humeur constante et son amitié.

Antoine Ghestem et Mickael Perrais pour les pauses "décompressions" ... mais vous n'étiez pas seuls.

L'ensemble du groupe « Neuroendocrinologie », chercheurs et techniciens : Michel Brunelle, Daniel Duviol, Daniel Leroy, Anne Loyens, Valérie Mitchell, Pierre Poulain, Vincent Prevot, Maryvonne Warembourg, ainsi que le groupe « Physiopathologie Neuronale » qui m'a supporté longtemps : Luc Buée, Marie-Laure Caillet-Boudin, Marie-Joëlle Dupire, Susanna Schraen. Mes pensées vont également vers Bernard Carette.

Un merci spécial pour Christine Kubisiak et Joëlle Vermeeren, « Cri Cri et Jojo », pour leur sourire.

Les étudiants, qui m'ont accompagné durant une ou plusieurs années : Alexandre, Carole, Danie, Fred, Laurence, Noëlle, Olivier, Patrice, Sandrine, Séverine, Sonia, Thierry, Xavier.

Encore merci à tous.

Je remercie sincèrement le Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille et la Région Nord-Pas-de-Calais pour m'avoir apporté le soutien financier nécessaire à la réalisation ce travail.

Ce travail a donné lieu aux publications et présentations suivantes :

LISTE DES PUBLICATIONS

- 2001 -

Knauf C, Mariot-Tran Van Chuoi M, d'Anglemon de Tassigny X, Mortreux G, Beauvillain JC, and Croix D. Stimulation of GnRH release by galanin at the rat median eminence : a possible NO-dependent and NO-independent transduction pathway. *En préparation*.

Prevot V, Knauf C, Stefano GB, Croix D and Beauvillain JC. Nitric oxide secretion from median eminence endothelial cells is involved in the control of GnRH release, *Recent Research Developments in Endocrinology*, 2001, Vol. 2 (sous presse).

Knauf C, Mariot-Tran Van Chuoi M, Mortreux G, Beauvillain JC and Croix D. Involvement of NPY Y2 receptor subtype in the control of the spontaneous NO / GnRH release, *Neuroreport* 2001, 12(15) : 3365-3369.

Knauf C, Ferreira S, Hamdane M, Mailliot C, Prevot V, Beauvillain JC and Croix D. Variation of endothelial Nitric Oxide Synthase synthesis in the median eminence during the rat estrous cycle: an additional argument for implication of vascular blood vessel in the control of GnRH release, *Endocrinology* 2001 142(10) : 4288-4294.

Knauf C, Prevot V, Stefano GB, Mortreux G, Beauvillain JC, and Croix D. Evidence for a spontaneous Nitric Oxide release from the rat median eminence : Influence on Gonadotropin-Releasing Hormone release, *Endocrinology* 2001, 142(6) : 2343-2350.

LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES

- 2001 -

Mitchell V, Bouret S, Lecompte F, Knauf C, Decroq N, Poulain P, Croix D et Beauvillain JC. Rôle de la galanine dans le contrôle hypothalamique de la reproduction. XIX^{ème} congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Liège, 30 Septembre 2001 – 03 Octobre 2001.

Knauf C. Implication du monoxyde d'azote (NO) dans le contrôle de la sécrétion du GnRH : rôle de l'endothélium. 1^{ère} Journée André Verbert, Lille, 19 Septembre 2001.

Croix D, Knauf C. Implication du monoxyde d'azote dans la libération de GnRH. Conférence sur invitation. INRA, Jouy-en-Josas, 15 Mai 2001.

Beauvillain JC, Prevot V, Bouret S, Knauf C, Lecompte F, Mariot M, Croix D et Mitchell V. Estradiol et GnRH. Conférence sur invitation. 3^{ème} journée de la Société de Médecine de la Reproduction, Lyon, 11-12 Mai 2001.

Knauf C. Implication de l'endothélium dans le contrôle des neurosécrétions au niveau de l'éminence médiane : Rôle du monoxyde d'azote (NO). Conférence sur invitation. Université des Sciences Exactes et Naturelles, Reims, le 04 Avril 2001.

- 1999 -

Knauf C, Prevot V, Mailliot C, Bouret S, Mortreux G, Buée L, Beauvillain JC et Croix D. Mise en évidence d'une libération spontanée de monoxyde d'azote par des fragments d'éminence médiane chez la rate : Implication sur la sécrétion de GnRH. 3^{ème} journée du réseau LARC-Neurosciences, Amiens, 8 Octobre 1999.

LISTE DES COMMUNICATIONS AFFICHEES

- 2001 -

Knauf C, Mariot-Tran Van Chuoi M, Jirou-Najou JL, Xavier d'Anglemont de Tassigny, Mortreux G, Beauvillain JC et Croix D. Implication du récepteur Y2 dans le contrôle de la libération spontanée de NO / GnRH au niveau de l'éminence médiane de rate. 5^{ème} journée du réseau LARC-Neurosciences, Rouen, 19 Octobre 2001.

Knauf C, Mariot Tran Van Chuoi M, Mitchell V, Beauvillain JC et Croix D. Influence de la galanine sur la libération de NO par l'éminence médiane de rat : rôle dans la sécrétion de GnRH. XIX^{ème} congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Liège, 30 Septembre 2001 - 03 Octobre 2001.

Knauf C, Ferreira S, Hamdane M, Mailliot C, Prevot V, Caillet-Boudin ML, Buée L, Beauvillain JC et Croix D. Variations de l'expression de la NOS endothéliale et de la caveolin-1 au cours du cycle œstral dans l'éminence médiane de rate: Influence des stéroïdes gonadiques. 5^{ème} colloque de la Société des Neurosciences, Toulouse, 28-31 Mai 2001.

- 2000 -

Knauf C, Ferreira S, Hamdane M, Mailliot C, Prevot V, Beauvillain JC et Croix D. Etude des variations d'expression de l'ARNm et de la protéine eNOS au niveau de l'éminence médiane de rate au cours du cycle œstral. 4^{ème} journée du réseau LARC-Neurosciences, Lille, 20 Octobre 2000.

Knauf C, Ferreira S, Hamdane M, Mailliot C, Prevot V, Beauvillain JC et Croix D. Etude des variations d'expression de l'ARNm eNOS au niveau de l'éminence médiane de rate au cours du cycle œstral. 29^{ème} colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Poitiers, 12-14 Septembre 2000.

Knauf C, Prevot V, Mortreux G, Beauvillain JC et Croix D. Démonstration de l'existence d'une libération spontanée de NO par l'éminence médiane de rates au cours du cycle œstral : Importance de l'imprégnation stéroïdienne et implication sur la sécrétion de GnRH. NO 2000, Paris, 10 Mars 2000.

- 1999 -

Knauf C, Prevot V, Mailliot C, Bouret S, Mortreux G, Buée L, Beauvillain JC et Croix D. Mise en évidence de l'existence d'une libération pulsatile et cyclique de monoxyde d'azote d'origine endothéliale par des fragments d'éminence médiane de rat : Implication sur la sécrétion de GnRH. 4^{ème} colloque de la Société des Neurosciences, Marseille, 25-28 Mai 1999.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

	page
<i>Liste des abréviations</i>	3
Introduction	5
<i>Etat des connaissances</i>	5
<i>I / Système à GnRH</i>	7
1) Généralités	7
a) Découverte de la GnRH	7
b) Neuroanatomie du système à GnRH	8
2) L'éminence médiane	9
3) Libération de la GnRH : pulsatilité et cyclicité	11
4) Origine de la pulsatilité	12
5) Les différents facteurs intervenant dans le contrôle de la sécrétion de la GnRH au niveau de l'EM	14
a) Les stéroïdes gonadiques	15
b) Les neuropeptides	17
c) Les acides aminés excitateurs et inhibiteurs	20
d) Les catécholamines	22
e) Les facteurs d'origines gliale et périphérique	22
<i>II / Généralités sur le monoxyde d'azote (NO)</i>	24
1) Découverte du NO	24
2) Rôles dans différents systèmes physiologiques	25
3) Synthèse du NO	26
4) Biochimie du NO	27
5) Les différents types de NOS	28
a) la NOS neuronale	28
b) la NOS inductible	30
c) la NOS endothéliale	30
6) Les cibles privilégiées du NO	32
a) Action sur la guanylate cyclase	33
b) Action sur la cyclooxygénase	33
7) Techniques de détection du NO	34
8) Libération de neurotransmetteurs par le NO	35
a) Acétylcholine	36
b) Monoamines	36
c) Acides aminés	37
a) GABA et glutamate	37
b) Taurine	38

d) Peroxynitrites et libération de neurotransmetteurs	38
9) NO et libération de neuropeptides	38
10) Stimulation de la libération de NO par les neurotransmetteurs, neuropeptides	40
11) NO et système à GnRH	41
a) nNOS et GnRH	41
b) Immunoréactivité eNOS	43
c) NO et libération de la GnRH au niveau de l'EM	43
d) NO et cellules GT1	44
12) Libération du NO au niveau de l'EM : origines possibles	44
a) Origine neuronale	44
b) Origine endothéliale	45
<i>III / Objectifs de la thèse</i>	47
Objectifs	48
Résultats	49
<i>I / Etude du mode de sécrétion du NO au niveau de l'EM : Implication sur la sécrétion de la GnRH, rôle des stéroïdes, origine du NO mesuré</i>	49
Article 1.	
<i>II / Etude des variations de la eNOS dans l'EM au cours du cycle œstral et influence des stéroïdes sur l'expression de l'enzyme</i>	54
Article 2.	
<i>III / Implications des neuropeptides de l'émittance médiane dans la sécrétion spontanée de NO</i>	56
Articles 3 et 4.	
1) Rôle du NPY	56
2) Implication de la galanine dans le système NO / GnRH	59
<i>Résultats des contrôles annexes</i>	61
<i>Revue</i>	
Discussion	62
<i>I / Implication du NO dans la pulsativité de la GnRH</i>	62
<i>II / Origine du NO libéré de façon spontanée</i>	68
<i>III / Elément(s) générateur(s) de la sécrétion spontanée de NO au niveau de l'EM</i>	72
Conclusion et perspectives	79
Bibliographie	83

LISTE DES ABREVIATIONS

Liste des abréviations :

Ach : acétylcholine

ADNc : acide désoxy ribonucléique complémentaire

adx : surrénalectomisées

AMPA : DL-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionique acid

AMPc : adénosine mono-phosphate cyclique

APO : aire préoptique

ARNm : acide ribonucléique messenger

BH₄ : tetrahydrobioptérine

CaM : calmoduline

cav : caveolin

CRH : corticotropin releasing hormone

EDRF : endothelium-derived relaxing factor

EM : éminence médiane

EPR : electron paramagnetic resonance

eNOS : Nitric Oxide Synthase endothéliale

FAD : flavine adenine dinucleotide

FMN : flavine mononucleotide

FSH : hormone folliculo-stimulante

GABA : acide gamma amino butyrique

GalR : récepteur à la galanine

GALP : galanin-like peptide

GAP : GnRH-Associated Peptide

GAP-43 : Growth-Associated Protein-43

GC : guanylate cyclase

GMPc : guanosine mono-phosphate cyclique

GnRH : gonadotropin releasing hormone ou gonadolibérine

i.c.v. : intracérébroventriculaire

IL-1 : interleukine 1

iNOS : Nitric Oxide Synthase inductible

L-Arg : L-Arginine

L-NA : L-nitroarginine

L-NAME : N^G-nitro-L-arginine methyl ester

L-NIO : L-N⁵-(1-iminoethyl)ornithine
L-NMMA : N¹-monomethyl-L-Arginine
LH : hormone lutéinisante
LHRH : luteinizing hormone releasing hormone
LPS : lipopolysaccharide bactérien
LRF : luteinizing releasing factor
LTP : potentialisation à long terme
NA : noradrénaline
NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NMDA : N-methyl-D-Aspartate
NO : monoxyde d'azote
NOS : Nitric Oxide Synthase
nNOS : Nitric Oxide Synthase neuronale
NPY : neuropeptide Y
ODQ : 1*H*-(1,2,4)-oxodiazolo (4,3-*a*) quinoxalin-1-one)
OVLТ : organe vasculaire de la lame terminale
ovx : ovariectomisées
PGE₂ : prostaglandines E₂
PKA : protéine kinase AMPc-dépendante
PKC : protéine kinase C
PKG : protéine kinase GMPc-dépendante
SIN-1 : 3-morpholinosydnomine
SNAP : S-nitroso-D,L-acetyl-penicillamine
SNP : sodium nitroprusside
TGF : transforming growth factor
UTR : untranslated region

INTRODUCTION

Etat des connaissances

La reproduction est contrôlée, au niveau central, par les neurones à gonadolibérine ou GnRH, répartis de façon diffuse dans l'hypothalamus. Ces neurones projettent leurs terminaisons nerveuses au niveau de la zone externe de l'éminence médiane (EM), et libèrent la GnRH dans un réseau complexe de capillaires appelé le système porte hypothalamo-hypophysaire. La GnRH circule dans ces vaisseaux, et atteint les cellules gonadotropes de l'adénohypophyse où elle module la synthèse et la libération des gonadotrophines LH (hormone lutéinisante) et FSH (hormone folliculo-stimulante). Ces deux hormones sont cruciales à la spermatogenèse et à l'ovulation, processus indispensables à la survie des espèces.

Quelle que soit l'espèce, la sécrétion de la GnRH dans l'EM est pulsatile, et elle entraîne une libération pulsatile de la LH. Le ou les élément(s) générateur(s) de cette pulsativité de la libération de la GnRH restent très controversés. Plusieurs hypothèses sont évoquées pour expliquer cette pulsativité : 1) les neurones à GnRH pourraient posséder une activité pulsatile intrinsèque ; 2) différents facteurs neuronaux, présents dans différents noyaux hypothalamiques et dans l'EM, pourraient agir sur les neurones à GnRH et influencer leur activité ; 3) des substances d'origine gliale peuvent également moduler cette pulsativité ; 4) les hormones sexuelles influencent à tous les niveaux le fonctionnement des cellules à GnRH.

Certains travaux portent sur l'implication du monoxyde d'azote (NO) dans la régulation de ce système. Le NO, messenger gazeux ayant des propriétés facilitatrices pour passer les membranes biologiques, pourrait contrôler l'activité sécrétoire des neurones à GnRH, soit en activant les voies de transduction nécessaires à l'exocytose des granules contenant la GnRH, soit en agissant sur d'autres systèmes de neurotransmission connus pour

interagir avec le système à GnRH. Effectivement, le maintien d'une activité NOergique dans des conditions expérimentales *in vivo* et *in vitro*, est indispensable au bon déroulement du processus de libération de la GnRH.

Au niveau de l'EM, certains travaux ont impliqué le NO d'origine neuronale : en effet, des travaux ont montré l'importance du NO synthétisé par une population de neurones dont les fibres traversent la zone interne de l'EM pour se projeter au niveau de la neurohypophyse. Par contre, jusqu'aux travaux effectués au laboratoire, aucune étude ne s'était intéressée au rôle éventuel du NO synthétisé par les cellules endothéliales localisées dans les capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire proches des terminaisons nerveuses des neurones à GnRH.

Le but de ce travail de thèse a été de déterminer le mode de libération du NO au niveau de l'EM et son implication dans la libération de la GnRH. Pour cela, nous avons utilisé une technique originale de mesures ampérométriques permettant la détection directe et en temps réel du NO. Nos travaux se sont déroulés en 5 phases :

Déterminer si des EM de rates maintenues en survie libéraient spontanément du NO.

Etudier les corrélations de cette libération de NO avec celle de la GnRH.

Vérifier l'influence des stéroïdes gonadiques dans le système NO / GnRH.

Déterminer l'origine du NO mesuré.

Déterminer le ou les élément(s) générateur(s) de cette sécrétion de NO.

I / Le système à GnRH

1) Généralités

a) Découverte de la GnRH

Au début des années 60, l'équipe de McCann (1960) démontre que la libération de la LH par l'adénohypophyse pouvait être stimulée par une substance d'origine hypothalamique. Cette substance, localisée au niveau de l'aire préoptique (APO), l'aire suprachiasmatic, l'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (McCann, 1962) ne fut identifiée que 10 ans plus tard (Amoss *et al.*, 1971 ; Matsuo *et al.*, 1971 ; Schally *et al.*, 1971 ; Burgus *et al.*, 1972). Il s'agit d'un décapeptide de séquence pyroGlu – His – Trp – Ser – Tyr – Gly – Leu – Arg – Pro – Gly-NH₂, connu successivement sous les noms de LRF ou «Luteinizing Releasing Factor», LHRH ou «Luteinizing Hormone Releasing Hormone», et GnRH ou «Gonadotropin Releasing Hormone». Ce peptide est modifié au niveau de ses extrémités amino et carboxy terminales, ce qui a ralenti son séquençage.

Plusieurs isoformes de la GnRH, ainsi que les gènes correspondants, ont été décrits dans la littérature (Fernald et White, 1999). La première forme, citée précédemment, est la GnRH-I. Le gène codant pour cette GnRH a été décrit chez l'homme (Seeburg et Adelman, 1984) et chez le rat (Adelman *et al.*, 1986). Une autre forme a été découverte chez le poulet, la GnRH-II ou [His⁵ Trp⁷ Tyr⁸]GnRH (Miyamoto *et al.*, 1984). Ce dernier peptide est remarquable car on le retrouve dans toutes les espèces animales, et apparaît être une forme très conservée de la GnRH (King *et al.*, 1994). D'autres formes ont été retrouvées dans des espèces différentes et il semble qu'une même espèce de mammifères présente toujours au moins deux, et parfois trois formes de GnRH. Ces formes proviennent de gènes différents et

sont exprimées dans des régions spécifiques. Ainsi chez le rat, la GnRH-I est exprimée dans l'hypothalamus, la GnRH-II au niveau du mésencéphale, et la GnRH-III au niveau du télencéphale (Kasten *et al.*, 1996).

La structure de base des gènes codant la GnRH est la même pour toutes les isoformes (Seeburg et Adelman, 1984). Un ARNm «préprohormone GnRH» code pour la GnRH et un peptide GAP (GnRH-Associated Peptide). Cet ARNm «préprohormone GnRH» est constitué de quatre exons (FIGURE 1) :

- L'exon 1 code pour une région 5'-UTR (Untranslated region).
- L'exon 2 code pour un peptide signal, la GnRH, un site de clivage protéolytique et la partie amino terminale du GAP.
- L'exon 3 code pour la partie centrale du GAP.
- L'exon 4 code pour la partie carboxy terminale du GAP et une région 3'-UTR.

Les tailles des régions UTR et des introns sont très différentes en fonction de la GnRH traduite, par opposition aux exons 2 et 3. Au début des années 90, Gautron *et al.* (1991) ont isolé une GnRH-I ayant subi une modification post-traductionnelle. En effet, le résidu proline en position 9 s'est vu rajouter un groupement hydroxyl. Cette GnRH, appelée [hyp⁹]GnRH, s'est avérée être moins efficace pour stimuler la libération de LH / FSH *in vivo* et *in vitro*. Son rôle semble être beaucoup plus important au cours du développement, notamment au moment du déclenchement de la puberté (Rochdi *et al.*, 2000).

b) Neuroanatomie du système à GnRH

Au cours des années 70, l'équipe de Barry identifiait les corps cellulaires de neurones à GnRH ainsi que leurs sites de projection axonique dans le cerveau de rongeurs (Leonardelli

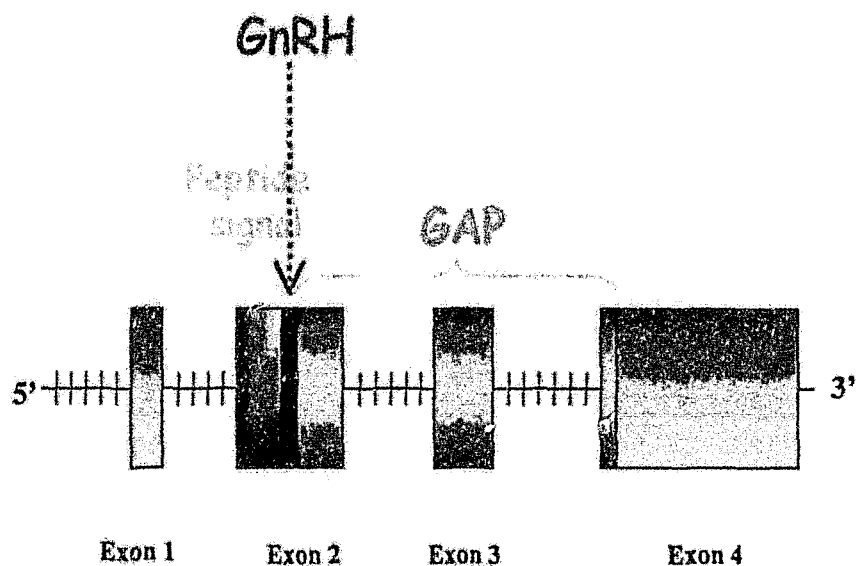


FIGURE 1. Représentation schématique de l'organisation des gènes de la GnRH (d'après Fernald RD et White RB, 1999). En orange, région codant pour le peptide signal ; en vert, région codant pour la GnRH ; en bleu région codant pour le GnRH-associated peptide (GAP) ; en gris, région codant les extrémités 5' et 3' UTR (Untranslated region); hachures rouges, introns.

et al., 1973 ; Barry *et al.*, 1973a, 1973b), puis chez les primates (Barry *et al.*, 1976). Les travaux de cette équipe aboutirent également à démontrer l'existence de variations d'activité de ces neurones au cours du cycle œstral (Barry et Dubois, 1974 ; Barry et Croix, 1978).

Quelle que soit l'espèce, le nombre de neurones à GnRH est extrêmement faible, à savoir environ 800 chez le hamster (Jennes et Stumpf, 1980), 1600 chez le rat (Wray et Hoffman, 1983) et 2400 chez le babouin (Marshall et Goldsmith, 1980). Chez le rat, la grande majorité des corps cellulaires des neurones à GnRH est localisée dans l'APO médiane (Selmanoff *et al.*, 1980), mais quelques cellules immunoréactives ont été localisées au niveau du bulbe olfactif, des bandes diagonales de Broca, du septum médian, du noyau préoptique périventriculaire et de l'hypothalamus latéral (King *et al.*, 1982 ; Merchenthaler *et al.*, 1984). La plus grande partie des neurones à GnRH se projette au niveau de l'EM (Merchenthaler *et al.*, 1980, 1984 ; Kawano et Daikoku, 1981 ; King *et al.*, 1982 ; Hoffman et Gibbs, 1982). Le couplage de techniques utilisant des traceurs rétrogrades et de l'immunohistochimie a permis de démontrer que, chez le rat, 50 à 75 % des neurones à GnRH qui se projettent au niveau de l'EM proviennent des régions septales, de l'APO médiane et de la région préoptique périventriculaire (Silverman *et al.*, 1987 ; Merchenthaler *et al.*, 1989). Certains neurones à GnRH se projettent également vers les organes circumventriculaires tels que l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT) (King *et al.*, 1982).

2) L'éminence médiane

L'EM, encore appelée tige hypophysaire, est une structure hypothalamique reliant l'hypothalamus à l'adénohypophyse. Cette région, d'une longueur de 2.5 mm chez le rat, est constituée (FIGURE 2) :

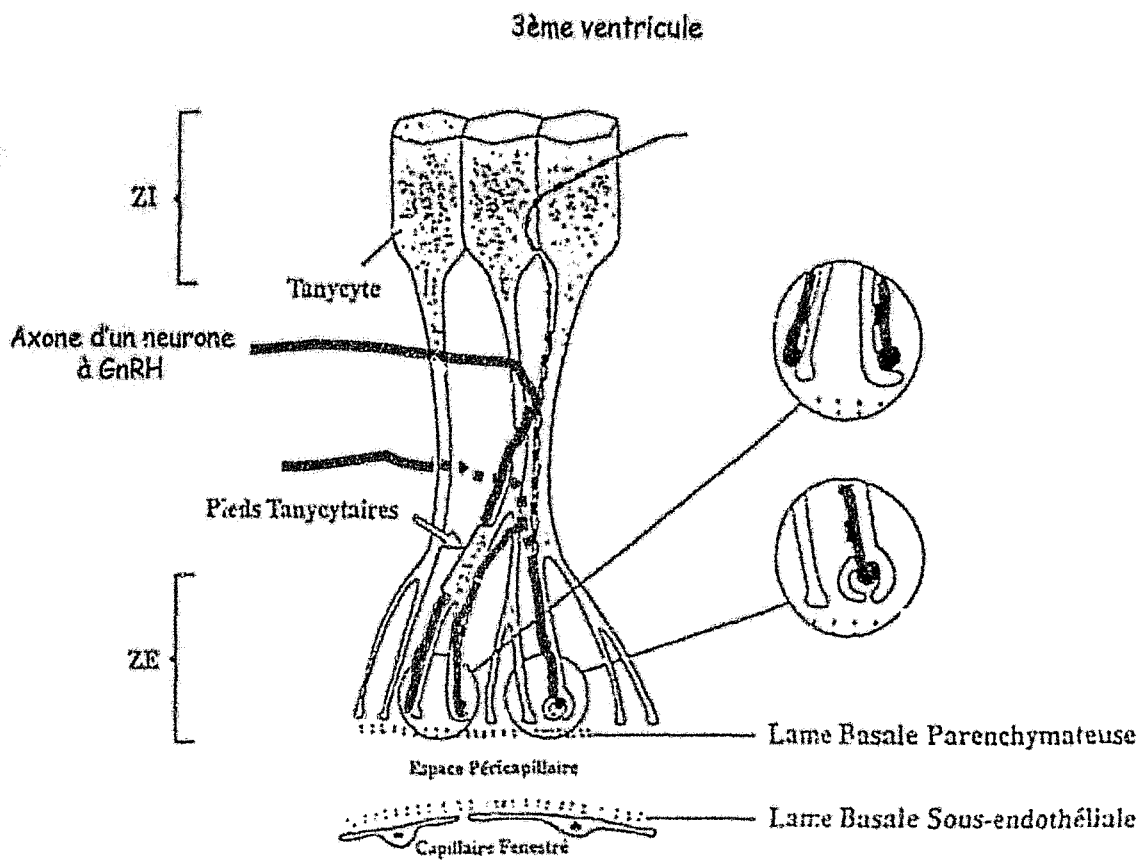


FIGURE 2. Schéma de l'éminence médiane en coupe sagittale.
 ZI: Zone Interne; ZE: Zone externe.

- d'une couche épendymaire contenant les corps cellulaires des tanocytes, cellules gliales spécifiques de l'EM, reliées entre elles par des jonctions serrées, empêchant ainsi toute communication, via les espaces intercellulaires, entre le troisième ventricule et les capillaires portes (Brightman et Reese, 1969).

- d'une zone interne, zone de passage de fibres axoniques de neurones qui se projettent vers la neurohypophyse.

- d'une zone externe, constituée essentiellement de terminaisons nerveuses contenant les neurohormones, de prolongements tanocytaires, et de capillaires fenestrés constituant le système porte hypothalamo-hypophysaire.

Par ailleurs, dans l'épaisseur de l'EM, on peut observer quelques astrocytes qui envoient des prolongements dans les différentes couches.

Les neurohormones peuvent être déversées dans les capillaires fenestrés. Ceux-ci sont entourés par un espace péricapillaire, délimité par deux membranes basales : une basale parenchymateuse et une basale endothéliale, bordant respectivement, le tissu nerveux et les capillaires (Barry, 1967).

Des études de microscopie électronique réalisées au laboratoire (Prevot *et al.*, 1998a, 1999a) ont montré l'existence de remaniements morphologiques au niveau de la zone externe de l'EM pour faciliter le passage de la GnRH dans le sang porte. À cet effet, le jour du proœstrus, jour qui précède l'ovulation et jour où la sécrétion de la GnRH augmente considérablement, 12.6% des neurones à GnRH rentrent en contact avec l'espace péricapillaire. Ces contacts se produisent alors grâce au bourgeonnement des terminaisons neuronales, au retrait des pieds tanocytaires, ainsi qu'à des évaginations de l'espace péricapillaire. L'augmentation de l'expression de GAP43 (Growth-Associated Protein-43), marqueur de la croissance axonale, dans les neurones à GnRH, pourrait être l'un des éléments

de cette plasticité neuro-glio-endothéliale, et pourrait indiquer que les neurones à GnRH eux-mêmes sont très actifs dans ce phénomène de plasticité (Prevot *et al.*, 2000a).

3) Libération de la GnRH : pulsativité et cyclicité

Quels que soient l'espèce et le sexe de l'animal, la libération de la GnRH au niveau du système porte hypothalamo-hypophysaire est pulsatile, et est corrélée à une libération également pulsatile de la LH (Levine et Ramirez, 1982 ; Park *et al.*, 1989 ; Sarkar et Minami, 1995). Cette pulsativité est indispensable au bon fonctionnement de l'axe reproducteur. En effet, par opposition aux infusions cérébrales pulsatiles, les injections continues de GnRH perturbent la fonction gonadotrope (Belchetz *et al.*, 1978). Les mesures directes de GnRH au niveau de la circulation porte ou au niveau de l'EM ont abouti à la conclusion que la libération pulsatile de LH était la conséquence de la libération pulsatile de la GnRH (Carmel *et al.*, 1976 ; Clarke et Cummins, 1982 ; Levine *et al.*, 1982 ; Gearing et Terasawa, 1988).

Chez le rat femelle, la fréquence des pulses de la GnRH est d'environ 1 pulse toutes les 45 minutes et ne varie pas au cours du cycle œstral (Levine et Ramirez, 1982). Les mêmes travaux ont confirmé l'existence de cette pulsativité chez le rat mâle (Steiner *et al.*, 1982 ; Dluzen et Ramirez, 1987 ; Levine et Duffy, 1988).

Cependant, comme dans toutes les espèces de mammifères, il existe un pic préovulatoire de LH lié à un pic de GnRH.

Chez le rat femelle, le pic de LH observé l'après-midi du proœstrus est lié à une augmentation de l'amplitude des pics de GnRH qui croît considérablement et déclenche le pic préovulatoire de LH (Sarkar *et al.*, 1976 ; Levine et Ramirez, 1982 ; Ching, 1982).

Contrairement au rat, c'est la fréquence des pulses de GnRH et non l'amplitude qui augmente juste avant le pic préovulatoire de LH chez le mouton (Clarke et Cummins, 1985 ;

Caraty *et al.*, 1989). Chez les primates, le pic préovulatoire de LH est précédé à la fois par des augmentations de l'amplitude et de la fréquence des pulses de GnRH (Xia *et al.*, 1992 ; Pau *et al.*, 1993).

Les phénomènes de pulsativité et de cyclicité sont indispensables, chez la femelle, pour voir apparaître l'ovulation.

4) Origine de la pulsativité

L'élément générateur de la pulsativité de la GnRH ou «GnRH pulse-generator» (Lopez *et al.*, 1998) est encore loin d'être parfaitement caractérisé. Le GnRH pulse-generator a été décrit dans un premier temps, comme étant la résultante de bouffées de potentiels d'actions, encore appelée activité électrique multiunitaire. Ces bouffées sont générées par un groupe de neurones localisés dans l'hypothalamus. L'activité électrique globale de cette population neuronale, constituée de neurones à GnRH et / ou de neurones contrôlant les cellules à GnRH, aboutit donc à une libération pulsatile de GnRH / LH (Kawakami *et al.*, 1982 ; Kaufman *et al.*, 1985). Les groupes de neurones et les circuits synaptiques composant le GnRH pulse-generator et agissant aux niveaux des corps cellulaires et des terminaisons nerveuses à GnRH sont peu connus. Les neurones à GnRH, cellules effectrices de ce mécanisme pourraient : 1) être douées intrinsèquement d'une pulsativité, et / ou 2) recevoir des signaux qui seraient capables d'engendrer une libération pulsatile de la GnRH et dont l'origine serait à déterminer.

Cette pulsativité pourrait être essentiellement liée à des propriétés intrinsèques des cellules à GnRH. Ainsi, l'utilisation de cellules immortalisées GT1 (Mellon *et al.*, 1990) a ouvert de nombreuses possibilités quant à l'étude de l'activité pulsatile des neurones à GnRH. *In vitro*, ces cellules GT1 sécrètent la GnRH de façon pulsatile, à une fréquence proche de celle observée *in vivo* (Martinez de la Escalera *et al.*, 1992 ; Wetsel *et al.*, 1992). Cependant,

cette sécrétion pulsatile de la GnRH n'est pas accompagnée de cycles de transcription et de traduction (Pitts *et al.*, 2001).

L'utilisation récente de FM1-43, marqueur fluorescent des changements membranaires associés aux phénomènes sécrétoires, a permis de déterminer une fréquence des pulses de GnRH chez les cellules GT1 de 1.4 ± 0.1 par heure, et une durée des pulses de 17.3 ± 0.6 minutes (Vazquez-Martinez *et al.*, 2001). Dans cette même étude, l'ajout d'octanol, inhibiteur des jonctions communicantes, a perturbé l'activité synchrone des cellules GT1 et non leur activité pulsatile : la pulsatilité serait donc une propriété intrinsèque des neurones GT1 et les ponts cytoplasmiques existant chez les cellules GT1 ne seraient pas impliqués dans le phénomène de pulsatilité.

Des études récentes suggèrent que le Ca^{2+} serait un élément crucial de l'initiation et de la propagation des pulses de GnRH. Tout d'abord, les cellules GT1 présentent des bouffées de potentiel d'action associées à des oscillations de Ca^{2+} libre intracellulaire (Spergel *et al.*, 1996). Le blocage des canaux calciques au niveau de ces mêmes cellules, blocage qui empêche l'activité électrique spontanée, abolit la libération de GnRH par les cellules GT1 (Martinez de la Escalera *et al.*, 1992, 1995 ; Spergel *et al.*, 1996, Vazquez-Martinez *et al.*, 2001). L'activité sécrétoire intrinsèque des cellules GT1 serait la conséquence de changements coordonnés, périodiques, d'oscillations calciques dans chaque cellule (Nunez *et al.*, 2000).

Les neurones à GnRH de type I ont une origine extérieure au système nerveux central : ils dérivent de la placode olfactive embryonnaire, migrent au niveau du mésenchyme nasal, pénètrent dans le cerveau où les corps cellulaires vont atteindre leur position définitive. Leurs axones vont croître jusqu'à leurs cibles localisées notamment au niveau de l'EM, puis les neurones vont acquérir leur fonctionnalité. Ainsi, il a été démontré que des explants de culture

de placode olfactive de singe (Terasawa *et al.*, 1999a) et de mouton (Duittoz et Batailler, 2000) étaient capables de libérer la GnRH de façon pulsatile. Cette pulsatilité existe également au niveau de cultures organotypiques de placode olfactive obtenues à partir de fœtus de rat (Funabashi *et al.*, 2000). Ces types de cultures sont très intéressants puisque ces neurones à GnRH n'ont été en contact ni avec des neurones hypothalamiques, ni avec des cellules gliales. Mais il est important de noter que d'autres types cellulaires peuvent être présents dans ces cultures et influencer la libération de la GnRH, ce qui empêche de conclure définitivement à l'existence d'une propriété pulsatile intrinsèque des neurones à GnRH *in vivo*.

En conditions *ex vivo*, la présence des corps cellulaires des neurones à GnRH n'est pas nécessaire au maintien de l'activité pulsatile. En effet, des explants d'hypothalamus médio-basaux (Bourguignon et Franchimont, 1981, 1984 ; Bourguignon *et al.*, 1993) ou des fragments d'EM (Rasmussen, 1993) contenant les terminaisons nerveuses des neurones à GnRH séparées de leurs corps cellulaires, peuvent libérer la GnRH de façon pulsatile à une fréquence comparable à celle observée *in vivo*. Dans ces conditions expérimentales, la pulsatilité ne décroît qu'au bout de cinq heures de manipulations (Rasmussen, 1993).

Compte tenu de l'ensemble de ces observations, il apparaît donc que les neurones à GnRH sont probablement doués d'une pulsatilité intrinsèque mais qu'il existe d'autres foyers pouvant être présents dans l'hypothalamus médio-basal, et même plus précisément au niveau de l'EM, pouvant induire une pulsatilité dans la libération de la GnRH.

5) Les différents facteurs intervenant dans le contrôle de la sécrétion de la GnRH au niveau de l'EM

De nombreux facteurs (stéroïdes, neuropeptides, neurotransmetteurs, facteurs gliaux) sont capables de moduler la sécrétion de la GnRH dans les capillaires du système porte, en agissant soit directement au niveau des terminaisons nerveuses des neurones à GnRH, soit par des systèmes intermédiaires (neuronaux, gliaux et humoraux) capables d'entraîner, à leur tour, une libération de la GnRH au niveau des terminaisons nerveuses. Nous n'exposerons que les voies essentiellement impliquées dans la libération de la GnRH dans l'EM, dont les effets inhibiteurs ou stimulateurs ont été clairement démontrés, et non celles connues pour moduler l'activité des neurones à GnRH au niveau des corps cellulaires.

a) Les stéroïdes gonadiques

Chez la rate, le rôle des stéroïdes gonadiques dans le contrôle de la sécrétion de GnRH / LH au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire est extrêmement complexe (Mahesh et Brann, 1998). Au niveau central, les principaux systèmes neuronaux connus pour contrôler l'activité GnRH sont sous la dépendance de l'œstradiol et de la progestérone.

Depuis de nombreuses années, il était admis que les neurones à GnRH n'exprimaient pas les récepteurs aux œstrogènes, et ceci dans de nombreuses espèces, y compris le rat (Herbison et Theodosis, 1992). Ainsi, l'action des stéroïdes sur les neurones à GnRH semblait exclusivement indirecte, et mettait en œuvre des neurones exprimant les récepteurs aux stéroïdes et contrôlant l'activité des neurones à GnRH. Cependant, des travaux récents remettant en cause cette théorie montrent l'existence de récepteurs beta aux œstrogènes dans les neurones à GnRH dans des conditions *in vivo* (Hrahovszky *et al.*, 2000, 2001) et de récepteurs alpha *in vitro* (Shen *et al.*, 1998). Ainsi, les œstrogènes pourraient avoir un effet direct sur les neurones à GnRH, ce qui n'exclut pas une action indirecte majeure.

Au cours du cycle œstral, l'action des œstrogènes, aux niveaux hypothalamique et pituitaire, est biphasique : une première phase, que l'on appelle «rétroaction négative», au cours de laquelle les œstrogènes ont un effet inhibiteur sur le système à GnRH / LH ; et une deuxième phase nommée «rétroaction positive», indispensable à la survenue du pic préovulatoire de GnRH / LH (pour revue, voir Herbison, 1998). Ainsi, au niveau hypothalamique, le rétrocontrôle négatif, phase la plus longue du cycle œstral, impliquerait : 1) le GABA (acide γ -amino butyrique), considéré comme un élément majeur impliqué dans l'inhibition de la libération de la GnRH, et 2) les neurones à β -endorphine, qui sous l'effet des œstrogènes, diminueraient leur libération de β -endorphine pour «désinhiber» les neurones à GnRH au moment du pic préovulatoire de GnRH / LH. Le rétrocontrôle positif serait essentiellement exercé par des neurones possédant les récepteurs aux œstrogènes et synthétisant les acides aminés excitateurs, la noradrénaline et le neuropeptide Y. Les modes d'action de ces neuropeptides et neurotransmetteurs sur les neurones à GnRH seront détaillés ultérieurement.

Les rétrocontrôles négatif et positif exercés sur l'axe hypothalamo-hypophysaire sont liés également à la progestérone. Le rôle de la progestérone dans le système à GnRH semble être stimulateur au moment du pic préovulatoire : l'après-midi du proœstrus, les rates traitées avec le RU486 (Lee *et al.*, 1990), un stéroïde anti-progestérone, ou avec l'eostane (DePaolo, 1988), un inhibiteur de la synthèse de la progestérone, ont présenté une diminution de neurones à GnRH exprimant le marqueur d'activité c-fos. Selon les auteurs, le blocage de l'action ou de la synthèse de la progestérone peut entraîner une diminution de l'activité des neurones à GnRH. L'effet facilitateur de la progestérone sur le pic de LH est renforcé par les travaux de Lee *et al.* (1990) montrant que la supplémentation en œstradiol plus progestérone entraîne une augmentation de l'activité GnRH.

Chez le rat, l'effet inhibiteur de la progestérone sur l'axe gonadotrope serait une fonction physiologique cruciale limitant la durée du proœstrus à un jour (Freeman *et al.*, 1976). La progestérone agirait alors en altérant la synthèse et / ou l'activité de neurotransmetteurs, neuropeptides essentiels à l'activité sécrétoire des neurones à GnRH (Attardi *et al.*, 1997) : ainsi, les neurones à GnRH pourraient présenter des variations au niveau de la synthèse et / ou de la libération de la GnRH.

Si l'on s'intéresse à l'action directe de ces stéroïdes dans l'EM, il semblerait que la progestérone soit capable de stimuler une libération rapide de GnRH au niveau de l'EM d'animaux ovariectomisés (ovx) ayant subi préalablement une imprégnation œstrogénique (Kim et Ramirez, 1985). Au sein du laboratoire, Prevot *et al.* (1999b) ont démontré que des fragments d'EM de rat mâles maintenus en survie libèrent du NO en réponse à l'apport exogène de 17- β œstradiol. Ce NO est capable de stimuler en retour la libération de la GnRH. La testostérone testée dans cette même étude n'a pu stimuler une libération rapide de NO / GnRH. Compte tenu des observations de Kim et Ramirez (1985) et de Prevot *et al.* (1999b), l'œstradiol et la progestérone pourraient agir directement au niveau de l'EM, et stimuler la libération de la GnRH.

b) Les neuropeptides

Le neuropeptide Y (NPY) est un peptide de 36 acides aminés, largement distribué dans l'hypothalamus (Allen *et al.*, 1983 ; McDonald, 1988). De nombreux corps cellulaires de neurones à NPY ont été localisés dans le noyau arqué, et les axones de ces neurones se projettent essentiellement au niveau de l'APO (McDonald, 1988). Cependant, certaines fibres à NPY ont été décrites par certains auteurs dans l'EM, au niveau de la zone interne mais

également dans la zone externe, à proximité des vaisseaux portes (McDonald *et al.*, 1987 ; DeQuidt *et al.*, 1990). Le NPY est capable de stimuler la libération de la GnRH par des fragments d'hypothalamus médio-basaux maintenus en survie provenant de rates ayant subi une imprégnation stéroïdienne préalable (Crowley et Kalra, 1987). Dans des conditions expérimentales similaires, l'apport exogène de NPY sur des fragments d'EM maintenus en survie entraîne une libération de la GnRH dans le milieu, d'une façon dose dépendante (Sabatino *et al.*, 1990). *In vivo*, au cours du cycle œstral, la concentration en NPY tend à augmenter dans l'EM au moment du pic préovulatoire (Sahu *et al.*, 1989) : la quantité de NPY détectable dans les vaisseaux portes hypophysaires s'accroît le jour du proestrus (Sutton *et al.*, 1988) et stimule la libération de GnRH / LH (Besecke et Levine, 1994).

L'effet du NPY sur la libération de la GnRH se ferait essentiellement via deux types de récepteurs au NPY : le Y1 et le Y2. *In vitro*, les cellules GT1 expriment ces deux récepteurs, et leur stimulation entraîne une augmentation de la sécrétion de la GnRH (Besecke *et al.*, 1994). *In vivo*, l'activation du récepteur Y1 est connue pour provoquer la libération de la GnRH (Kalra *et al.*, 1992). Dans l'EM de rat, l'immunoréactivité pour le Y1 est détectée dans les terminaisons nerveuses des neurones à GnRH et dans les cellules endothéliales (Li *et al.*, 1999). En ce qui concerne le Y2, son importance sur la libération de la GnRH n'a été étudiée que chez les poissons (Peng *et al.*, 1993). Quelques cellules immunoréactives pour le Y2 ont été détectées dans l'hypothalamus humain (Caberlotto *et al.*, 1998).

La galanine est un peptide de 29 acides aminés isolé à partir de l'intestin de porc (Tatemoto *et al.*, 1983), dont les effets biologiques, extrêmement variés, seraient médiés par trois types de récepteurs : GalR1, GalR2 et GalR3 (Branchek *et al.*, 2000).

Dans le cerveau, la galanine est fortement exprimée au niveau de la zone externe de l'EM (Rokaeus *et al.*, 1984). Environ 60 % des terminaisons nerveuses à galanine de l'EM

proviennent du noyau arqué (Merchenthaler *et al.*, 1991). Chez le rat mâle, environ 20% des neurones à GnRH coexpriment la galanine (Merchenthaler *et al.*, 1990), alors que pour le rat femelle, le nombre de neurones coexprimant les deux peptides atteint 65% (Merchenthaler *et al.*, 1991). Dans cette même étude, les auteurs ont également démontré que la galanine pouvait stimuler la libération de la GnRH par des fragments d'hypothalamus médio-basaux *in vitro*. Dans ces conditions expérimentales, l'effet stimulateur de la galanine nécessiterait l'intervention de neurones noradrénergiques et par déduction, l'implication d'une voie de communication galanine / noradrénaline / GnRH (Lopez et Negrovilar, 1990).

La concentration en galanine dans le sang porte est 7 fois supérieure à celle retrouvée dans le sang périphérique. Sa libération dans le système porte est pulsatile chez le rat : les pulses de galanine ont une fréquence proche de ceux de la GnRH, soit environ 1 pulse par heure (Lopez *et al.*, 1991). Ces pulses sont de plus synchronisés avec les pulses de la GnRH : en effet, ils peuvent coïncider ou les précéder (Lopez *et al.*, 1991). Cette libération de la galanine est maximale le jour du proœstrus, concomitamment à celle de la GnRH, ce qui laisse supposer un rôle important de la galanine dans le contrôle de la libération pulsatile et cyclique de la GnRH.

Très récemment un nouveau peptide, le «galanine-like peptide» ou GALP, a été isolé et cloné à partir d'hypothalamus de porc (Ohtaki *et al.*, 1999). Ce peptide est fortement exprimé dans le noyau arqué et présente une forte affinité pour le GalR2 (Kerr *et al.*, 2000). Son action sur la sécrétion de la GnRH est inconnue pour le moment : seule une étude extrêmement récente a montré que l'injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) de GALP, chez le rat, entraîne une augmentation de la concentration en LH plasmatique, ainsi qu'une augmentation de l'activité c-fos au niveau des neurones à GnRH (Matsumoto *et al.*, 2001).

La β -endorphine, élaborée par des neurones à proopiomélanocortine localisés dans le noyau arqué (Finley *et al.*, 1981 ; Bronstein *et al.*, 1992), joue un rôle crucial dans l'inhibition de la libération de la GnRH (Kalra, 1993). Selon Faletti *et al.* (1999), la stimulation par la β -endorphine de récepteurs μ aux opioïdes, présents au niveau de neurones NOergiques et GABAergiques dans l'hypothalamus médio-basal, aurait pour effet d'inhiber l'activité NOS et de stimuler la libération de GABA. Il en résulte ainsi une diminution de la libération de la GnRH (Faletti *et al.*, 1999). Parallèlement, au cours du cycle œstral, la sécrétion de β -endorphine dans le sang porte est pulsatile, et sa concentration dans l'EM diminue fortement entre 1600h et 1800h le jour du proœstrus (Sarkar et Minami, 1995), au moment où la libération de la GnRH est maximale. Ainsi, une diminution de l'activité des neurones à β -endorphine serait, en partie, responsable de la survenue du pic de GnRH / LH (Allen et Kalra, 1986 ; Gabriel *et al.*, 1986).

Selon Nikolavakis *et al.* (1986), des coupes d'hypothalamus médio-basaux de rat (partant de l'APO rostrale jusqu'aux corps mamillaires) incubées en présence de corticotrophin releasing hormone ou CRH ont leur sécrétion de GnRH diminuée considérablement, mais les conditions expérimentales utilisées dans le cas présent ne permettent pas de savoir si la CRH agit au niveau des corps cellulaires, des axones, ou des terminaisons nerveuses à GnRH. En 1993, Rivest et Rivier ont montré, qu'*in vitro*, la CRH peut être inhibitrice sur la libération de la GnRH au niveau de l'EM.

c) Les acides aminés excitateurs et inhibiteurs

Les acides aminés glutamate et aspartate sont des neurotransmetteurs excitateurs facilitant la libération de la GnRH (Brann, 1995). L'utilisation d'antagonistes des récepteurs

N-méthyl-D-Aspartate (NMDA), DL- α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique (AMPA) et au kainate ont permis de démontrer que ces acides aminés jouaient un rôle dans la sécrétion pulsatile de la GnRH (Ping *et al.*, 1994) et le pic préovulatoire de GnRH / LH chez le rat femelle (Lopez *et al.*, 1990 ; Brann et Mahesh, 1991, 1993). Les effets du glutamate et de l'aspartate pourraient s'effectuer directement via des récepteurs NMDA-R1 et KA2 identifiés au niveau des corps cellulaires à GnRH mais aussi au niveau de terminaisons nerveuses dans la zone externe de l'EM (Kawakami, 1998a ; Eyigor et Jennes, 2000).

L'effet du GABA (acide γ -amino butyrique) sur la sécrétion de la GnRH reste très complexe. En fonction du stade du développement, le GABA est capable d'induire une hyperpolarisation ou une dépolarisation membranaire, ce qui aboutit respectivement à une inhibition ou à une stimulation de la libération des neurotransmetteurs et neuropeptides (Chertubini *et al.*, 1991).

Chez l'adulte, il semblerait que, selon le récepteur stimulé, GABA-A ou GABA-B, l'action du GABA serait stimulatrice ou inhibitrice (pour revue, Terasawa, 1998, 2001) : l'action du GABA sur la libération de la GnRH ne se ferait pas qu'au niveau de neurones à GnRH exprimant le récepteur GABA-A (Jung *et al.*, 1998), mais également sur des interneurones exprimant les récepteurs au GABA et pouvant contrôler l'activité des neurones à GnRH (Terasawa, 2001). Actuellement, les travaux *in vitro* de Nikolarakis *et al.* (1998) suggèrent que le GABA est stimulateur sur les péricaryons à GnRH par une inhibition des neurones opioïdiques, et inhibiteur sur les terminaisons nerveuses à GnRH. Cette hypothèse inhibitrice, au niveau de l'EM, est renforcée par les travaux de Seilicovich *et al.* (1995) qui montrent que le NO entraîne une libération de GABA par des fragments d'hypothalamus médio-basaux, ce qui inhibe la libération de la GnRH. Ainsi, en fonction de

la région hypothalamique considérée, on peut observer un effet inhibiteur ou stimulateur du GABA sur l'activité des neurones à GnRH.

d) Les catécholamines

La noradrénaline (NA) est connue pour être un puissant stimulateur de la libération de la GnRH. Son action se fait par l'activation de récepteurs adrénergiques $\alpha 1$ présents au niveau des terminaisons nerveuses des neurones à GnRH (Sarkar et Fink, 1981 ; Ojeda *et al.*, 1982), mais également présents au niveau de neurones NOergiques de l'EM (Rettori *et al.*, 1992).

L'existence de contacts axo-axoniques entre terminaisons à GnRH et terminaisons à dopamine a été clairement observée chez le rat à l'échelle ultrastructurale (Ajika, 1979). Les travaux de Rotsztein *et al.* (1977) ont permis de conclure que la dopamine était capable de stimuler une sécrétion de la GnRH par des fragments d'hypothalamus médio-basaux maintenus en survie.

e) Les facteurs d'origines gliale et périphérique

Certains facteurs d'origine gliale, tels que les membres de la famille des «Transforming Growth Factor» ou TGF, peuvent moduler l'activité des neurones à GnRH. *In vivo*, le TGF α est capable de stimuler la libération de la GnRH via une sécrétion de PGE₂ (Prostaglandines E₂) (Ojeda *et al.*, 1990), en provenance d'astrocytes (Ma *et al.*, 1997). *In vitro*, le TGF $\beta 1$ et le TGF $\beta 2$ sont capables de moduler l'expression de l'ARNm de la GnRH, ainsi que la libération de ce peptide par les cellules GT1 (Galbiati *et al.*, 1996 ; Messi *et al.*,

1999). De la même façon, l'activine, membre de la famille des TGF, peut intervenir en stimulant la sécrétion de la GnRH *in vitro* (Gonzalez-Manchon *et al.*, 1991) et *in vivo* (Lee et Rivier, 1997 ; Calogero *et al.*, 1998).

Des études récentes ont montré que la leptine, protéine de 16 KDa synthétisée essentiellement par le tissu adipeux, était largement impliquée dans les fonctions de reproduction (Caprio *et al.*, 2001 ; Chehab, 2000). A des doses faibles (de l'ordre de 10^{-12} à 10^{-10} M) et contrairement aux doses fortes (10^{-8} M), la leptine est capable de stimuler la sécrétion de la GnRH par des fragments d'EM-noyau arqué de rat (Yu *et al.*, 1997a) et par des cellules GT1 (Magni *et al.*, 1999). Cet effet de la leptine sur les fragments d'EM-noyau arqué semble nécessiter l'intervention du NO (Yu *et al.*, 1997b).

L'interleukine 1 (IL-1), cytokine polypeptidique, est considérée comme un messager bidirectionnel entre les systèmes immuns et endocriniens (Besedovsky et del Rey, 1992). Deux types d'IL-1 ont été identifiés : IL-1 α et IL-1 β . Au niveau du cerveau de rat, des neurones immunoréactifs pour l'IL-1 (Lechan *et al.*, 1990) ainsi que leurs récepteurs (Katsunra *et al.*, 1988) ont été détectés dans l'hypothalamus. Chez la rate, des expériences de push-pull cannulae dans l'EM ont montré que l'injection i.c.v. d'IL-1 β entraîne une diminution importante de la libération de la GnRH le jour du proœstrus (Rivest et Rivier, 1993b). De plus, l'injection i.c.v. continue de cette cytokine diminue l'expression et la libération de la GnRH, ce qui aboutit à une perturbation du cycle œstral de la rate, caractérisée par un blocage en diœstrus (Rivest *et al.*, 1993). Cependant, si un rôle sur la libération de la GnRH est envisageable, l'action de l'IL-1 β sur l'activité des neurones à GnRH s'effectuerait essentiellement au niveau des corps cellulaires dans l'APO (Kalra *et al.*, 1990a, 1990b ; Rivest *et al.*, 1993).

II / Généralités sur le monoxyde d'azote (NO)

1) Découverte du NO

L'histoire du NO et la découverte de son rôle de messenger cellulaire gazeux débutent à la fin des années 70. A cette époque, deux équipes, celles de Murad et de Ignarro, ont leurs axes de recherche basés sur l'étude des mécanismes de la vasodilatation. Elles démontrent que la guanylate cyclase (GC) cytosolique, permettant la relaxation des muscles lisses vasculaires, peut être activée par des vasodilatateurs nitrés (nitroglycérine, nitroprussiate, NO) couramment utilisés en clinique (Katsuki *et al.*, 1977 ; Arnold *et al.*, 1977 ; Gruetter *et al.*, 1979 ; Mellion *et al.*, 1981 ; Rapoport et Murad, 1983).

Parallèlement, le travail de Furchgott et Zawadzki (1980) a permis de montrer le rôle crucial des cellules endothéliales dans le phénomène de vasodilatation des artères. Alors que l'acétylcholine, médiateur de la jonction neuromusculaire, était connue pour avoir un effet vasorelaxant *in vivo*, elle provoque un effet contraire vasoconstricteur sur des préparations de vaisseaux sanguins isolés *in vitro*. Ainsi, en isolant des segments d'aorte de lapin, ces chercheurs se sont rendu compte que la séparation de l'endothélium des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire, provoquait une disparition de l'effet «relaxant». Or, l'effet relaxant était rétabli dans des préparations *in vitro* type «sandwich» superposant endothélium et cellules musculaires lisses. Le terme d'EDRF (Endothelium-Derived Relaxing Factor) fut alors donné pour désigner la substance labile qui stimulait la GC des cellules musculaires vasculaires, et provoquait ainsi la vasorelaxation (Cherry *et al.*, 1982).

Le rassemblement de toutes ces données permis à ces chercheurs d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'EDRF était le NO.

La preuve finale fut apportée par l'équipe de Moncada qui démontra, par chimioluminescence, que des cellules endothéliales d'aorte en culture synthétisaient du NO en quantité suffisante pour expliquer l'effet de l'EDRF (Palmer *et al.*, 1987). En 1987, Ignarro *et al.* complétèrent ces travaux et prouvèrent que l'EDRF avait bien toutes les propriétés chimiques et biologiques du NO.

Ces travaux ont permis au NO d'être baptisé «molécule de l'année» en 1992 par le journal «Science», et à Furchgott, Ignarro et Murad d'obtenir le Prix Nobel de Médecine en 1998.

2) Rôles dans différents systèmes physiologiques

Le NO est un gaz radicalaire produit naturellement par de nombreuses cellules (pour revue, Aoki *et al.*, 1995). Il apparaît être une molécule clef intervenant dans le contrôle de nombreuses fonctions biologiques.

Son rôle le plus connu est celui de vasorelaxant : en effet, l'endothélium des vaisseaux, en réponse à divers stimuli (augmentation du débit sanguin entraînant des contraintes de cisaillement, stimulation des récepteurs à l'acétylcholine sur les cellules endothéliales), peut libérer du NO. Ce NO stimule alors la GC présente dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux, entraînant une synthèse de guanosine mono-phosphate cyclique (GMPc). Le GMPc va jouer alors son rôle de second messenger et provoquer une diminution du Ca^{2+} libre intracellulaire. Ceci se traduit par une relaxation des cellules musculaires lisses, d'où la dilatation des vaisseaux (Palmer *et al.*, 1987 ; Ignarro, 1989). Le NO participe aussi à l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Radomski *et al.*, 1991).

Le NO est impliqué dans les mécanismes de réponses immunitaires non-spécifiques. En effet, en présence de cytokines pro-inflammatoires et de produits d'origine bactérienne

comme les endotoxines, les macrophages peuvent libérer des quantités de NO très importantes, cytotoxiques, qui vont permettre la destruction d'agents pathogènes ou de cellules tumorales (Hibbs *et al.*, 1987 ; Nathan *et al.*, 1991).

La découverte d'une activité NOergique dans le cerveau (Bredt *et al.*, 1991 ; Dawson *et al.*, 1991) a bouleversé le monde des Neurosciences. Des éléments montrant l'implication du NO dans le contrôle de la libération de neurotransmetteurs (pour revue, Ohkuma et Katsura, 2001), la plasticité neuronale (pour revue, Haley et Schuman, 1994), le stress (pour revue, Lopez-Figueroa *et al.*, 1998) ont été décrits, ainsi que dans bien d'autres domaines tels que l'ischémie cérébrale (Strijbos, 1998) et la maladie d'Alzheimer (De la Torre et Stefano, 2000, Law *et al.*, 2001).

A l'échelle de la biologie moléculaire, le NO participe à la régulation de l'expression des gènes par ses interactions avec les facteurs de transcription (NF- κ B, AP-1, Sp1,...), ses régulations post-transcriptionnelles et post-traductionnelles (pour revue, Bogdan, 2001).

Le NO est également impliqué dans la physiologie de la reproduction, notamment au niveau de l'ovulation, la maturation des oocytes (Jablonka-Shariff *et al.*, 1998), la synthèse d'œstradiol (Olson *et al.*, 1996), la lordose et l'érection (Mani *et al.*, 1994). Les effets centraux du NO sur le contrôle de la reproduction, et notamment son action sur la synthèse et la libération de la GnRH, seront détaillés ultérieurement.

3) Synthèse du NO

Le NO est synthétisé par des enzymes appelées Nitric Oxide Synthase (NOS) (Bredt et Snyder, 1990). Ces enzymes catalysent la transformation de la L-Arginine (L-Arg) en L-Citrulline et NO (Palmer *et al.*, 1988 ; Marletta *et al.*, 1988 ; Hibbs *et al.*, 1988). Cette réaction d'oxydation de la L-Arg se déroule en deux étapes. La première étape consiste en une

hydroxylation de la L-Arg en N^G -hydroxyl-Arginine. Cette molécule intermédiaire est ensuite oxydée en L-Citrulline et NO (Marletta *et al.*, 1988) (FIGURE 3).

Les enzymes NOS sont constituées d'un dimère, équivalent à deux monomères identiques, qui peuvent eux-mêmes être divisés en deux domaines principaux : un domaine carboxy-terminal ayant une activité réductase, et un domaine amino-terminal ayant une activité oxygénase. La forme «dimère» existe en présence d'un groupement hème (Klatt *et al.*, 1996). Les domaines réductase et oxygénase possèdent différents sites de liaison à différents cofacteurs et cosubstrats, à savoir, respectivement, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), et L-Arg, Fe^{2+} , tetrahydrobioptérine (BH_4) (FIGURE 4).

4) Biochimie du NO

L'oxydation de la L-Arg aboutit donc à la synthèse de NO. Ce gaz incolore a une demi-vie très courte, inférieure à 7 secondes. Le NO est apolaire, ce qui lui confère des propriétés facilitatrices pour passer à travers les membranes biologiques, et diffuser à travers les tissus. Son pouvoir de diffusion dans les tissus, tel que le cerveau, est d'environ 300 μm (Wood et Garthwaite, 1994 ; Garthwaite et Boulton, 1995).

Dans les conditions physiologiques, les concentrations normales en NO, mesurées *in vivo*, varient entre 10 et 100 nM (Shibuki et Okada, 1991 ; Malinski and Taha, 1992). Dans des conditions anormales, notamment lors d'une ischémie cérébrale induite chez le rat (Malinski *et al.*, 1993), la sécrétion de NO peut atteindre des valeurs comprises entre 2 et 4 μM . Ces fortes concentrations, observées en conditions expérimentales (Gross *et al.*, 1994) ou lors de conditions physiologiques particulières (inflammations, pathologies), sont néfastes pour l'organisme (Janero, 2000).

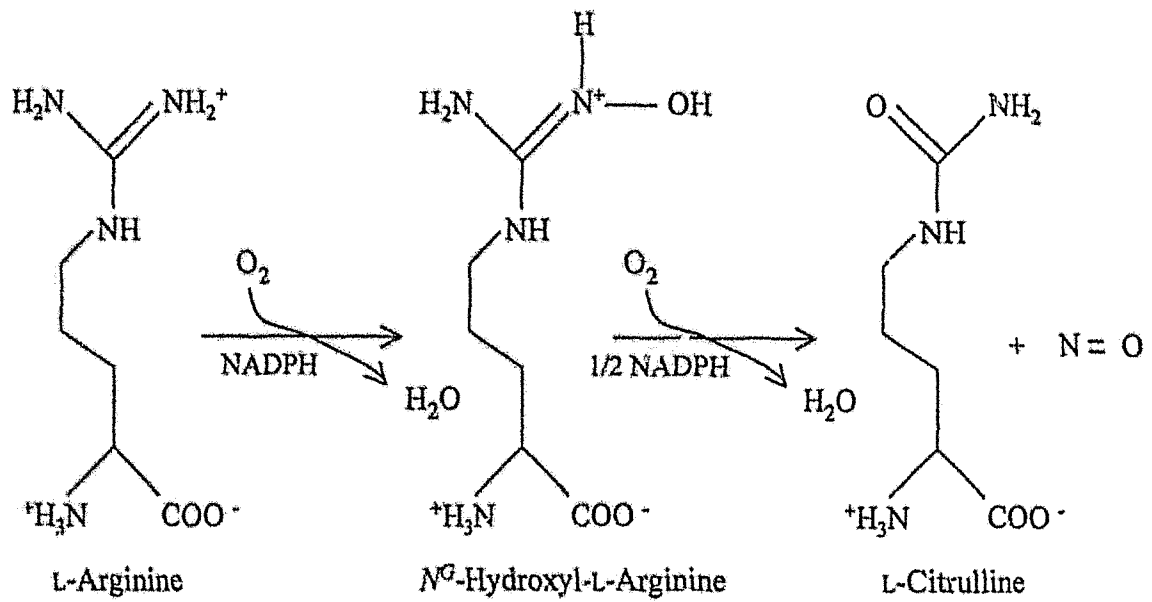


FIGURE 3. Synthèse du NO par les Nitric Oxide Synthase (NOS).

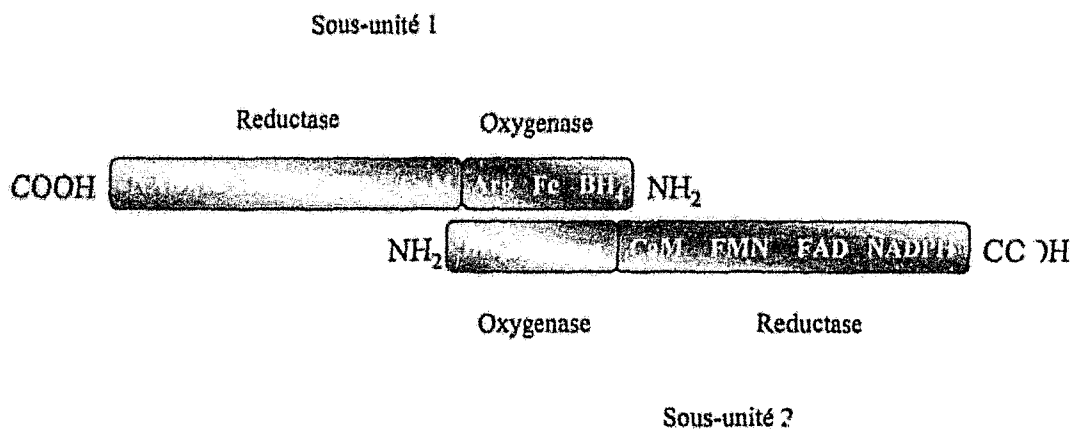


FIGURE 4. Schéma représentatif de la structure des dimères constituant les NOS. Chaque dimère est constitué d'un domaine réductase et d'un domaine oxydase où viennent se fixer différents cofacteurs et cosubstrats.

Wink et al. (1996) distinguent ainsi deux types d'effets du NO :

- les effets dits « directs » (activation d'enzymes par exemple), qui correspondent à l'interaction du NO avec les molécules biologiques. Ces effets existent quand les concentrations en NO sont faibles (< à 1 μM).

- les effets indirects, résultant de la combinaison du NO avec l'oxygène (O_2) ou l'ion superoxyde (O_2^-). Ces effets apparaissent quand le NO est fortement libéré (> à 1 μM). La réaction NO / O_2 aboutit à la synthèse de dinitrogen trioxide (N_2O_3), tandis que la réaction NO / O_2^- entraîne une formation de peroxynitrites (ONOO^-). Ces molécules sont à l'origine des effets cytotoxiques du NO (pour revue, Wink and Mitchell, 1998).

5) Les différents types de NOS

Trois types de NOS ont été identifiées, à savoir : la NOS de type I (NOS neuronale ou nNOS), la NOS de type II (NOS inductible ou iNOS), et la NOS de type III (NOS endothéliale ou eNOS). La nomenclature respecte l'ordre dans lequel les NOS ont été purifiées et leurs ADNc respectifs isolés. Les trois isoformes des NOS sont capables de fixer les flavines, la BH_4 et la calmoduline (CaM) (Marsden *et al.*, 1993 ; Xu *et al.*, 1993).

a) la NOS neuronale

La nNOS a été la première NOS découverte et purifiée à partir de cerveaux de rat et de porc (Bredt and Snyder, 1990 ; Mayer *et al.*, 1990 ; Schmidt *et al.*, 1991). Cette enzyme de 160 kD se retrouve également au niveau du muscle squelettique de rat (Gath *et al.*, 1997), et dans de nombreux tissus (pour revue, Förstermann *et al.*, 1998). Son expression est

constitutive, et son activité est régulée par des mécanismes dépendants du calcium (Ca^{2+}) et de la calmoduline ($\text{Ca}^{2+} / \text{CaM}$).

Dans le cerveau, la nNOS est liée à la membrane postsynaptique par l'intermédiaire d'une protéine neurale postsynaptique (PSD95). En réponse à une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire, la nNOS se libère de la PSD95 et interagit avec le complexe $\text{Ca}^{2+} / \text{CaM}$. La nNOS, transloquée dans le cytoplasme, va être alors déphosphorylée par la calcineurine, ce qui provoque ainsi son activation (Wang et Marsden, 1995 ; Dawson *et al.*, 1998) (FIGURE 5).

Au niveau des modifications post-traductionnelles, la nNOS peut subir différentes phosphorylations pouvant modifier son activité. La nNOS peut être phosphorylée au niveau de différents résidus sérine et thréonine par différentes kinases : les protéines kinases AMPc-dépendantes (PKA), les protéines kinases C (PKC), les protéines kinases GMPC-dépendantes (PKG), les protéines kinases $\text{Ca}^{2+} / \text{CaM}$ dépendantes (Nakane *et al.*, 1991 ; Brune et Lapetina, 1991 ; Dinerman *et al.*, 1992 ; Dinerman *et al.*, 1994a).

Ces travaux aboutissent, pour l'instant, à des résultats totalement contradictoires :

- certains auteurs démontrent que seule la PKA phosphorylerait la nNOS, sans modifier son activité (Brune et Lapetina, 1991).

- d'autres constatent une phosphorylation par la PKC et une augmentation de l'activité NOS en réponse à cette modification (Nakane *et al.*, 1991).

La tendance actuelle serait plutôt en faveur d'une nNOS inactive à l'état phosphorylé (Dinerman *et al.*, 1994) notamment au niveau des résidus Sérine⁸⁴⁷ (Hayashi *et al.*, 1999) et Sérine²⁴¹ (Zoche *et al.*, 1997). Cette phosphorylation empêcherait la fixation du complexe $\text{Ca}^{2+} / \text{CaM}$ à la nNOS.

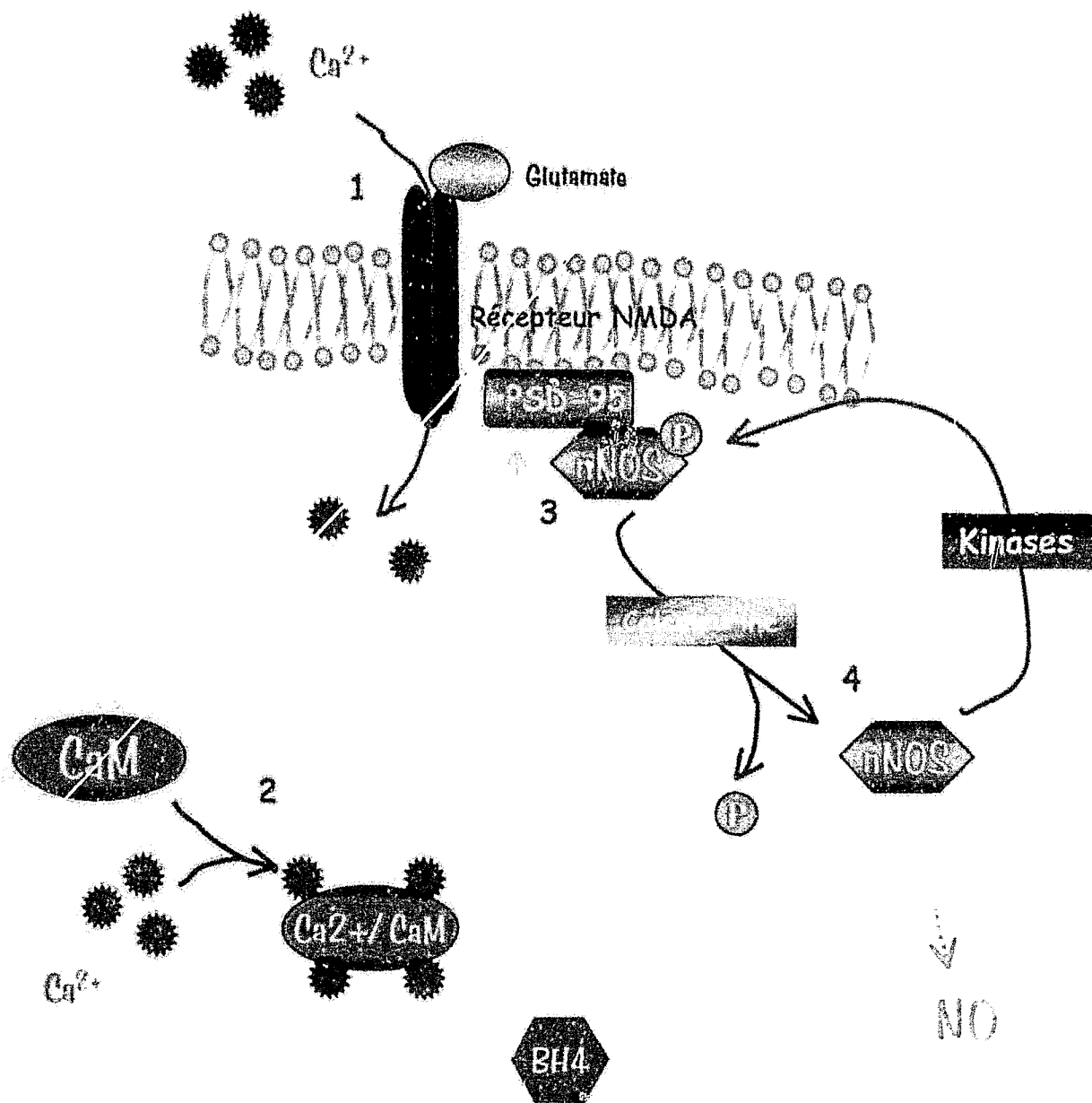


FIGURE 5. Exemple de l'activation de la nNOS par un neurotransmetteur (ici, le glutamate). Cinq étapes pour obtenir une synthèse de NO : 1) entrée de Ca^{2+} par des récepteurs NMDA stimulés par le glutamate; 2) formation d'un complexe Ca^{2+} / Calmoduline; 3) dissociation de la nNOS de la PSD-95; 4) déphosphorylation de la nNOS et synthèse de NO; 5) nouvelle phosphorylation et retour à la membrane sous forme inactive.

b) la NOS inductible

Cette isoenzyme de 130 KDa a été isolée dès 1991 à partir de macrophages de souris (Hevel *et al.*, 1991 ; Stuehr *et al.*, 1991). La iNOS n'est pas exprimée constitutivement : en effet, son expression est induite dans de nombreuses cellules en réponse à différents facteurs tels que le lipopolysaccharide bactérien (LPS) et / ou les cytokines proinflammatoires (Hevel *et al.*, 1991 ; Stuehr *et al.*, 1991). Bien que la iNOS ait la possibilité de fixer la calmoduline, son activité est Ca^{2+} indépendante (Cho *et al.*, 1992 ; Stevens-Truss et Marletta, 1995).

A l'heure actuelle, aucun mécanisme permettant de réguler son activité n'a été mis en évidence. Les quantités de NO produites par la iNOS sont extrêmement importantes, de l'ordre du μM , par opposition aux NOS «constitutives» qui libèrent du NO dans des valeurs comprises entre le pM et le nM (Nathan et Xie, 1994 ; Marletta, 1994 ; Förstermann *et al.*, 1995). Les fortes libérations de NO par les macrophages sont à la base des réponses immunitaires, comme il a été décrit précédemment.

c) la NOS endothéliale

La eNOS a tout d'abord été identifiée au niveau des cellules endothéliales (Förstermann *et al.*, 1991 ; Pollock *et al.*, 1991). De nombreux tissus expriment cette enzyme (pour revue, Förstermann *et al.*, 1998), et de façon surprenante, quelques cellules neuronales localisées dans l'hippocampe (Dinerman *et al.*, 1994b) contiennent ce type de NOS. Son expression est, tout comme celle de la nNOS, constitutive, et son activité est Ca^{2+} / CaM dépendante (Förstermann *et al.*, 1991 ; Pollock *et al.*, 1991).

La eNOS peut subir différents types de modifications co- et post-traductionnelles telles que des myristoylations (Busconi et Michel, 1993), des palmitoylations (Robinson *et*

al., 1995), et des phosphorylations (Michel *et al.*, 1993). Ces modifications sont essentielles à son activité. La myristoylation de l'eNOS est une modification co-translationnelle irréversible. Cette réaction est catalysée par la *N*-myristoyltransférase (Resh, 1994 ; Casey, 1995) et permet l'ajout d'un résidu myristate au niveau de la partie amino-terminale de l'eNOS, sur un résidu Glycine². Par opposition, la palmitoylation de l'eNOS est réversible et se déroule après la traduction (Resh, 1994).

Ces deux modifications sont essentielles au maintien subcellulaire de la eNOS au niveau des caveolae (Parton, 1996). Les caveolae sont de petites invaginations de la membrane plasmique, riches en cholestérol, intervenant dans la transcytose et la pinocytose (Shaul et Anderson, 1998). Ces invaginations sont présentes dans toutes les cellules, sauf au niveau des neurones et des lymphocytes (Shaul et Anderson, 1998). Elles sont constituées de protéines de structure de 21 à 24 KDa, appelées caveolin (cav). Ces cav ont un rôle crucial dans la transduction des signaux car elles assurent la compartimentalisation des molécules telles que les facteurs de croissance et les récepteurs hormonaux (Shaul et Paterson, 1998, Okamoto *et al.*, 1998). La cav de type 1 est fortement représentée dans les cellules endothéliales. Au niveau de ces cellules, la cav-1 peut être co-immunoprécipitée avec l'eNOS (Feron *et al.*, 1996), ce qui suggère une interaction entre ces deux molécules. Elle est constituée de 33 résidus incorporés dans la membrane, entourés par des régions amino et carboxy terminales cytoplasmiques (Okamoto *et al.*, 1998). Une partie de la région carboxy terminale de la cav-1 peut interagir avec les domaines oxygénase et réductase de la eNOS (Ghosh *et al.*, 1998), ce qui a pour effet d'inhiber la synthèse du NO (Ju *et al.*, 1997 ; Michel *et al.*, 1997a, 1997b ; Garcia-Cardena *et al.*, 1997 ; Michel et Feron, 1997). En effet, il y a «compétition» entre la cav-1 et la CaM pour se fixer à la eNOS, et donc pour, respectivement, l'inhiber ou l'activer (Michel *et al.*, 1997b). En conditions expérimentales, l'effet inhibiteur de la cav-1 est complètement aboli par le complexe Ca²⁺ / CaM (Michel *et al.*, 1997a).

Un modèle d'activation de la eNOS est proposé par Feron (1999) : la stimulation d'un récepteur par un agoniste entraîne une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire. Il va, dès lors, se former un complexe Ca^{2+} / CaM qui permet la dissociation du complexe eNOS / cav-1. La eNOS se retrouve alors transloquée vers des sites intracellulaires (probablement le trans-Golgi ou la région périnucléaire) où elle sera active et synthétisera du NO. La libération de la eNOS de la membrane plasmique nécessite également une dépalmitoylation. Le retour à l'état inactif de la eNOS, c'est-à-dire retour au niveau de la membrane plasmique, est provoqué par une nouvelle interaction eNOS / cav-1, et par une nouvelle palmitoylation de l'eNOS (Feron *et al.*, 1998) (FIGURE 6).

Nous noterons également que l'activité de la eNOS est régulée par des phosphorylations ayant lieu au niveau du cytoplasme. En fonction du site de phosphorylation touché, la eNOS peut être soit inactive, soit active. Ainsi, la phosphorylation par une PKC de la Thréonine⁴⁹⁵ localisée au niveau du domaine de fixation à la CaM (domaine réductase) entraîne une diminution de l'activité NOS (Bredt *et al.*, 1992). Par ailleurs, la phosphorylation du résidu Sérine¹¹⁷⁷ par les kinases Akt permet d'augmenter de façon significative la synthèse de NO en provenance de la eNOS ; les kinases Akt ne phosphorylent ni la nNOS, ni la iNOS (Michell *et al.*, 1999 ; Fulton *et al.*, 1999).

6) Les cibles privilégiées du NO

L'activation des enzymes NOS aboutit à la synthèse de NO. Dans les conditions normales, ce gaz diffusible va rentrer en contact avec ses deux récepteurs directs : la guanylate cyclase (GC) et la cyclooxygénase (COX).

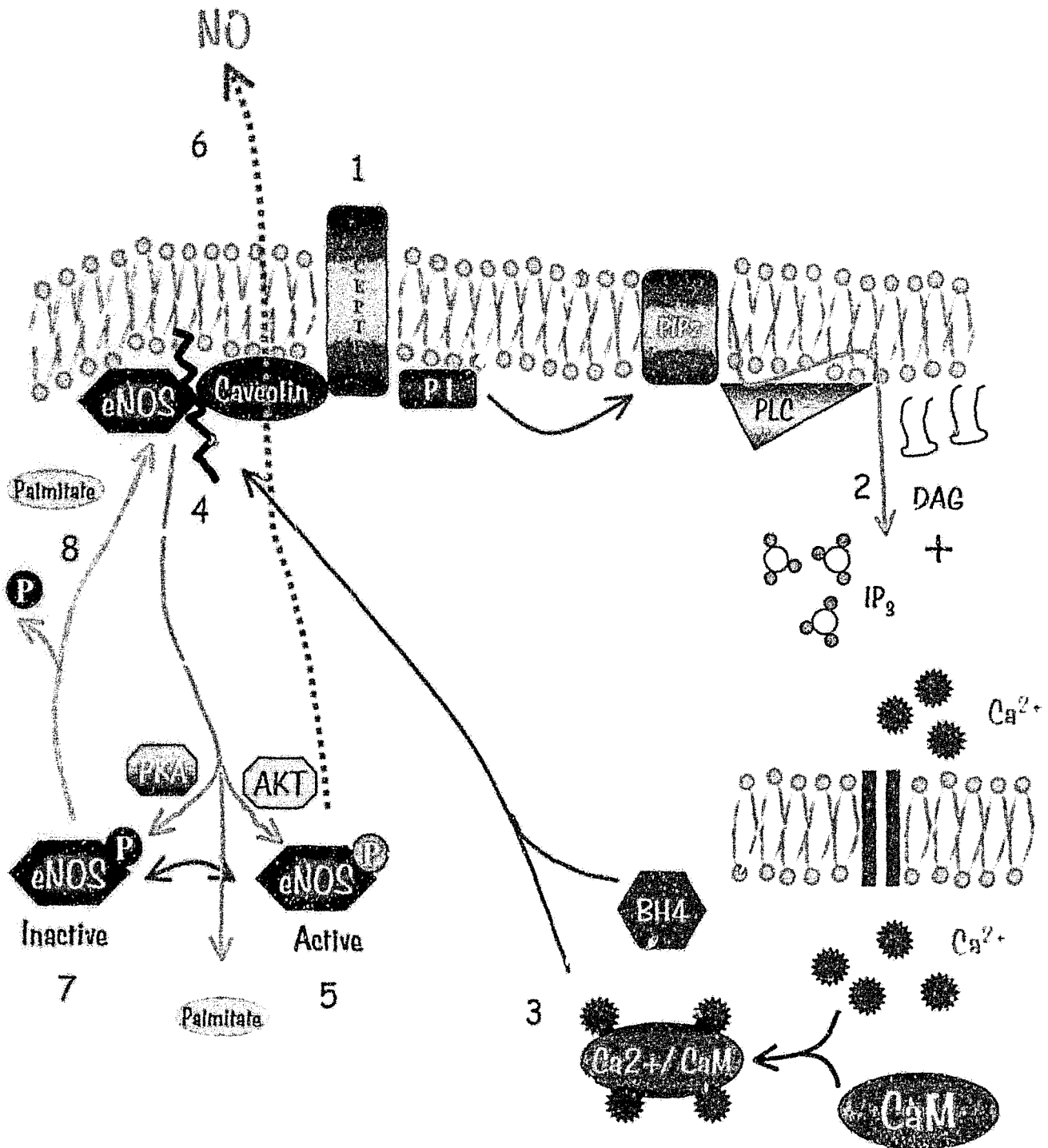


FIGURE 6. Schéma récapitulatif de l'interaction eNOS / cav1. Huit étapes sont nécessaires à la constitution d'un cycle d'activation / désactivation, à savoir : 1) fixation d'un agoniste sur son récepteur, 2) transduction du signal aboutissant à une mobilisation des stocks intracellulaires de Ca²⁺, 3) formation d'un complexe Ca²⁺ / Calmoduline, 4) dissociation du complexe eNOS / cav-1 et dépalmitoylation, 5) translocation de l'eNOS vers des sites intracellulaires où elle va subir des phosphorylations qui vont l'activer, 6) synthèse de NO, 7) retour de l'eNOS sous une forme inactive grâce à d'autres types de phosphorylation, 8) retour à la membrane, repalmitoylation et fixation à la cav-1.

a) Action sur la guanylate cyclase

La GC soluble (GCs) catalyse la transformation de la guanosine 5'-triphosphate (GTP) en GMPc. Cette enzyme, présente dans de nombreux tissus de mammifères (White et Auerbach, 1969), est impliquée, via le GMPc, dans de nombreuses voies de transduction régulant la relaxation du muscle squelettique, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et la transmission synaptique (Lincoln et Cornwell, 1993 ; Garthwaite *et al.*, 1988 ; Walter, 1989). Ces effets s'effectuent par l'intermédiaire de protéines kinases, de canaux ioniques et de phosphodiesterases dont les mécanismes d'action sont dépendants du GMPc (Zagotta et Siegelbaum, 1996 ; Lohman *et al.*, 1997 ; Degerman *et al.*, 1997).

La GCs est une enzyme hétérodimérique, constituée de deux sous-unités α et β , auxquelles vient se greffer un groupement hème (Garbers et Lowe, 1994 ; Drewett et Garbers, 1994). Les composés chimiques contenant du NO ont été considérés comme des stimulateurs potentiels de la GCs (Murad *et al.*, 1978 ; Böhme *et al.*, 1978). Puis, l'«EDRF» ou NO a été identifié comme étant l'élément central de l'activation de la GCs (Palmer *et al.*, 1987).

La formation d'un complexe entre le fer central du groupement hème et le NO provoque une modification conformationnelle de la GCs permettant l'activation de l'enzyme (Ignarro *et al.*, 1986) d'un facteur 400 par rapport à son activité de base (Harteneck *et al.*, 1991 ; Tomita *et al.*, 1997).

b) Action sur la cyclooxygénase

L'autre enzyme interagissant avec le NO est la COX. Deux isoformes de l'enzyme ont été répertoriées : une forme constitutive, appelée COX 1 (De Witt, 1991) et une forme inductible, COX 2, trouvée au niveau des cellules endothéliales (Maier *et al.*, 1990), des

fibroblastes (Raz *et al.*, 1990) et des macrophages traités au LPS et à l'interleukine 1 beta (IL-1 β) (Masferrer *et al.*, 1992). Tout comme la GCs, les COX contiennent, au niveau de leur site actif, un groupement hème ferreux (de Groot *et al.*, 1975 ; Kalyanaranman *et al.*, 1982), ce qui en font des cibles pour le NO. Au début des années 90, Salvemini *et al.* (1993) démontrent que le sodium nitroprusside (SNP), un donneur de NO, stimule la production de prostaglandines E₂ (PGE₂) par COX 1 et COX 2 recombinantes. Cet effet stimulateur du NO sur les COX n'est valable que pour les concentrations en NO faibles, libérées par les NOS constitutives. Par contre, les concentrations en NO beaucoup plus fortes, correspondant à du NO synthétisé par la iNOS, sont inhibitrices sur la COX (Stadler *et al.*, 1993 ; Wink et Michell, 1998).

7) Techniques de détection du NO

Quelques techniques sont, à l'heure actuelle, disponibles pour mesurer soit directement le NO, soit la résultante de son activité.

Pour les techniques indirectes, les protocoles sont basés sur les dosages du GMPc (Ignarro *et al.*, 1987 ; Shikano *et al.*, 1988), résultant de l'activation de la GCs, et par les dosages de la L-Citrulline (Hecker *et al.*, 1990), issue de la transformation de la L-Arg par les NOS. Ces techniques, relativement simples à mettre au point, sont peu sensibles, dans le sens où elles ne rendent compte que d'une activité NOergique, sans mesurer le NO directement. Ces dosages ne tiennent pas compte, par exemple, du fait que la GC peut être activée en absence de NO (Stasch *et al.*, 2001), d'où de nombreuses approximations quand à la véritable quantité de NO mesurée. De plus, elles ne permettent pas de visualiser les variations de sécrétion du NO en temps réel. Certaines méthodes colorimétriques, comme celles de Griess (Pratt *et al.*, 1995), sont essentiellement basées sur la mesure des taux de nitrites par

diazotation : les nitroxides et l'acide sulfanilique interagissent avec le N-(1-naphthyl)ethylenediamine pour générer un produit détectable par spectrophotométrie.

Les dosages par chimioluminescence (Palmer *et al.*, 1988) utilisent les propriétés physico-chimiques du NO. En effet, le NO peut interagir avec l'ozone et générer de la lumière ($\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2^* + \text{O}_2$; $\text{NO}_2^* \rightarrow \text{NO}_2 + h\nu$). Le signal obtenu étant amplifié dans ces systèmes, les résultats sont également approximatifs.

D'autres techniques très complexes, inadaptées à l'étude des systèmes de neurotransmission dépendants du NO, et donc utilisées moins fréquemment, permettent la mesure du NO : c'est le cas de l'EPR (Electron Paramagnétique Resonance) (Maples *et al.*, 1991), la chromatographie en phase gazeuse (Pai *et al.*, 1987) et la spectrométrie de masse (Gustafsson *et al.*, 1991 ; Palmer *et al.*, 1988).

L'utilisation de microélectrodes permettant spécifiquement la mesure du NO, libéré par un tissu ou des cellules, a considérablement aidé à l'étude du rôle de ce gaz (Malinski et Taha, 1992). Cette technique ne perturbe pas le milieu de survie, et permet de mesurer directement la sécrétion de NO, en temps réel, sans passer par des molécules intermédiaires. La description de ce matériel, que nous avons utilisé pour notre étude, ainsi que le principe de détection, seront développés ultérieurement.

8) Libération de neurotransmetteurs par le NO

Les stimulations de la GCs et de la COX par le NO aboutissent donc, respectivement, à la synthèse de GMPc et de PGE₂. Le GMPc va activer les conductances cationiques (Fesenko *et al.* 1985), ce qui produit la dépolarisation des cellules nerveuses, entraînant la libération de neurotransmetteurs. De leur côté, les PGE₂ permettent la mobilisation des stocks

intracellulaires de Ca^{2+} (Ojeda et Negrovilar, 1985) et la synthèse d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Ojeda *et al.*, 1985), ce qui favorise le mécanisme d'exocytose.

Les études concernant la libération des neurotransmetteurs sous l'influence du NO nécessitent l'emploi de techniques *in vivo* (technique de push-pull superfusion, microdialyse) ou *in vitro* (cultures cellulaires, synaptosomes, coupes de tissus).

a) Acétylcholine

Prast et Phillipu (1992) ont montré, à l'aide d'une technique de push-pull perfusion, qu'un donneur de NO, SIN-1 (3-morpholinosydnonimine), stimulait la libération d'acétylcholine (Ach) au niveau du cerveau moyen. Cet effet est antagonisé par un inhibiteur des NOS, le L-nitroarginine (L-NA). Ces effets stimulateurs du NO sur la sécrétion d'Ach se retrouvent également au niveau du striatum de rat (Prast *et al.*, 1995). Le mécanisme d'exocytose de l'Ach en présence de NO est dépendant du GMPC (Prast *et al.*, 1998).

b) Monoamines

L'application directe de L-Arg, précurseur de la synthèse du NO, au niveau de l'aire préoptique médiane de rat, par microdialyse, stimule la libération de dopamine. Cet effet disparaît en présence d'un inhibiteur de NOS, le L-NMMA ou N^G -monométhyl-L-Arginine (Lorrain et Hull, 1993). Des études comparables ont été entreprises sur des coupes de striatum de rat (Zhu et Luo, 1992 ; Lonart *et al.*, 1993), aboutissant à des conclusions similaires.

D'une façon similaire, les donneurs de NO sont capables de stimuler la libération de noradrénaline (Lonart *et al.*, 1992 ; Satoh *et al.*, 1996a, 1996b) ou de sérotonine (Lowart *et al.*, 1992) à partir de coupes d'hippocampe de rat.

Au niveau de l'APO médiane (Lorrain et Hull, 1993) et du striatum de rat (Guevara-Guzman *et al.*, 1994), la libération de sérotonine est activée respectivement par la L-Arg et les donneurs de NO. Ces donneurs de NO influencent la libération de sérotonine de façon diphasique : au niveau de l'hypothalamus de rat, l'application de faibles concentrations en NO diminue le relargage de sérotonine, par opposition aux concentrations plus élevées qui stimulent sa libération par un mécanisme dépendant du GMPc (Kaehler *et al.*, 1999). Nous pouvons noter ici que les concentrations dites «faibles» atteignent tout de même 500 nM, et les fortes 1 μ M et plus.

c) Acides aminés

a) GABA et glutamate

Les travaux *in vitro* de Guevara-Guzman *et al.* (1994) ont montré que les donneurs de NO (*S*-nitroso D,L acetyl penicillamine ou SNAP, SNP) appliqués sur des coupes de striatum de rat induisent une libération de GABA et de glutamate par un mécanisme dépendant du GMPc. Par des techniques de push-pull perfusion, Segoria *et al.* (1994) réussissent à stimuler la libération de GABA et de glutamate au niveau de l'hippocampe et du striatum de rat en présence de SIN-1.

Les libérations du GABA et du glutamate apparaissent être biphasiques : à faibles concentrations, le SNAP diminue la libération basale de glutamate dans l'hippocampe contrairement aux concentrations fortes (Segieth *et al.*, 1995). On retrouve des résultats similaires dans la même région pour la libération du GABA (Getting *et al.*, 1996). Ces résultats laissent supposer qu'il existerait des sécrétions de NO qui, en fonction de la quantité

libérée et de la région cérébrale considérée, pourraient inhiber ou stimuler la libération de neurotransmetteurs.

β) Taurine

Le NO a des effets stimulateurs, au niveau du striatum, sur la libération de la taurine (Guevara-Guzman *et al.*, 1994). De plus, l'application de donneurs de NO sur des cultures primaires de neurones corticaux de souris provoque une libération de taurine (Chen *et al.*, 1996), ce qui démontre l'implication du NO dans ce système.

d) Peroxynitrites et libération de neurotransmetteurs

Bien que généralement néfastes pour les tissus, certains auteurs confèrent aux peroxynitrites un rôle de neurotransmetteurs. En effet, à l'aide de modèles précédemment cités (cultures cellulaires,...), Ohkuma *et al.* (1995a, 1995b, 1996) ont démontré que les peroxynitrites stimulaient d'une façon dose-dépendante la libération d'Ach et de GABA. L'effet du NO sur la libération des neurotransmetteurs, ne serait donc pas uniquement médié par le NO lui-même, mais les peroxynitrites pourraient participer au phénomène. Les mécanismes aboutissant à la libération de neurotransmetteurs par les peroxynitrites restent à découvrir.

9) NO et libération de neuropeptides

Au niveau hypothalamique, certains auteurs ont constaté l'existence d'une colocalisation nNOS / ocytocine et nNOS / vasopressine (Calka et Block, 1993 ; Nylén *et al.*,

2001). Le NO, sur ces deux systèmes, est connu pour avoir un effet inhibiteur sur la libération de ces peptides. En effet, l'injection i.c.v. d'inhibiteurs des NOS augmente les taux d'ocytocine plasmatique (Summy-Long *et al.*, 1993); alors que les donneurs de NO font chuter la sécrétion de vasopressine (Yasin *et al.*, 1993 ; Summy-Long *et al.*, 1993).

Bonavera *et al.* (1996) ont démontré l'influence du NO dans le contrôle de la libération du NPY *in vitro*. L'ajout de L-Arg dans le milieu de survie contenant un fragment d'APO entraîne une augmentation de la sécrétion de NPY. *In vivo*, l'effet stimulateur du NO sur la libération de la GnRH (voir Introduction, II, *Chapitre 11*) est aboli par l'injection i.c.v. d'oligonucléotides antisens du NPY, ce qui laisse supposer une voie de communication NO → NPY → GnRH.

Le NO intervient aussi dans la régulation de la libération de la CRH. Les effets de donneurs de NO, comme le SNP, sur la sécrétion de CRH par des fragments d'hypothalamus (contenant les corps cellulaires et les terminaisons nerveuses des neurones à CRH) ne sont pas clairs. Costa *et al.* (1993) ont montré que l'ajout de donneurs de NO ou de L-Arg sur ces fragments ne perturbe pas la libération basale de CRH. Dans des conditions expérimentales similaires, Karanth *et al.* (1993) et Raber *et al.* (1995) montrent que des fragments d'hypothalamus libèrent du CRH en réponse au SNP après 20 à 30 minutes. Le rôle du NO dans le système à CRH est renforcé par les travaux de Prevot *et al.* (1998b), qui montrent que des fragments d'EM contenant des terminaisons nerveuses des neurones à CRH, libèrent du NO en réponse à la morphine, susceptibles d'induire une libération de CRH. Ces effets stimulateurs du NO sur la libération de la CRH sont également observés par Lee *et al.* (1999): l'injection i.c.v. d'un donneur de NO augmente la concentration plasmatique d'ACTH, et cet effet est aboli par des anticorps anti-CRH.

10) Stimulation de la libération de NO par les neurotransmetteurs, neuropeptides

En plus d'une voie de communication NO → Neurotransmetteurs / Neuropeptides, il existe une voie inverse Neurotransmetteurs / Neuropeptides → NO.

Dans ce sens, l'interaction Glutamate / NO / GMPc est actuellement l'une des voies les plus étudiées. Elle est essentielle au phénomène de plasticité synaptique nécessaire à l'apprentissage et à la mémoire, comme la potentialisation à long terme (LTP) (pour revue, Haley et Schuman, 1994). Schématiquement, ces processus se caractérisent par l'activation de récepteurs NMDA au niveau de la membrane post-synaptique de neurones exprimant la nNOS. Ceci a pour effet d'augmenter la concentration en Ca^{2+} intracellulaire dans les neurones post-synaptiques, ce qui va stimuler la synthèse et la libération de NO. Ce NO peut alors agir en retour sur les neurones présynaptiques glutamatergiques, et va stimuler la GCs : le taux de GMPc va alors augmenter et favoriser les cascades de transduction de signaux nécessaires à la libération du glutamate. Le système va, dès lors, fonctionner en boucle : Glutamate → NO → Glutamate (FIGURE 7).

Consolo *et al.* (1998) ont trouvé que les taux de GMPc libérés dans le milieu extracellulaire au niveau de l'hippocampe peuvent être significativement augmentés par la galanine. Cet effet est bien spécifique de la galanine, car il est totalement aboli par l'antagoniste spécifique des récepteurs galaninergiques, à savoir le M40 (Bartfai *et al.*, 1993). Le L-NAME (*N*^G-nitro-L-arginine methyl ester, inhibiteur des NOS), l'ODQ (1*H*-(1,2,4)-oxodiazolo (4,3-*a*) quinoxalin-1-one, inhibiteur de la GC), et le MK801 (antagoniste du récepteur NMDA) sont également capables de faire disparaître ces effets : l'effet stimulateur de la galanine sur le NO pourrait passer via le récepteur NMDA.

D'après les travaux de Yokko *et al.* (1987), le NPY est capable d'inhiber la libération de NA au niveau de coupes hypothalamiques. Cette action inhibitrice du NPY sur la NA

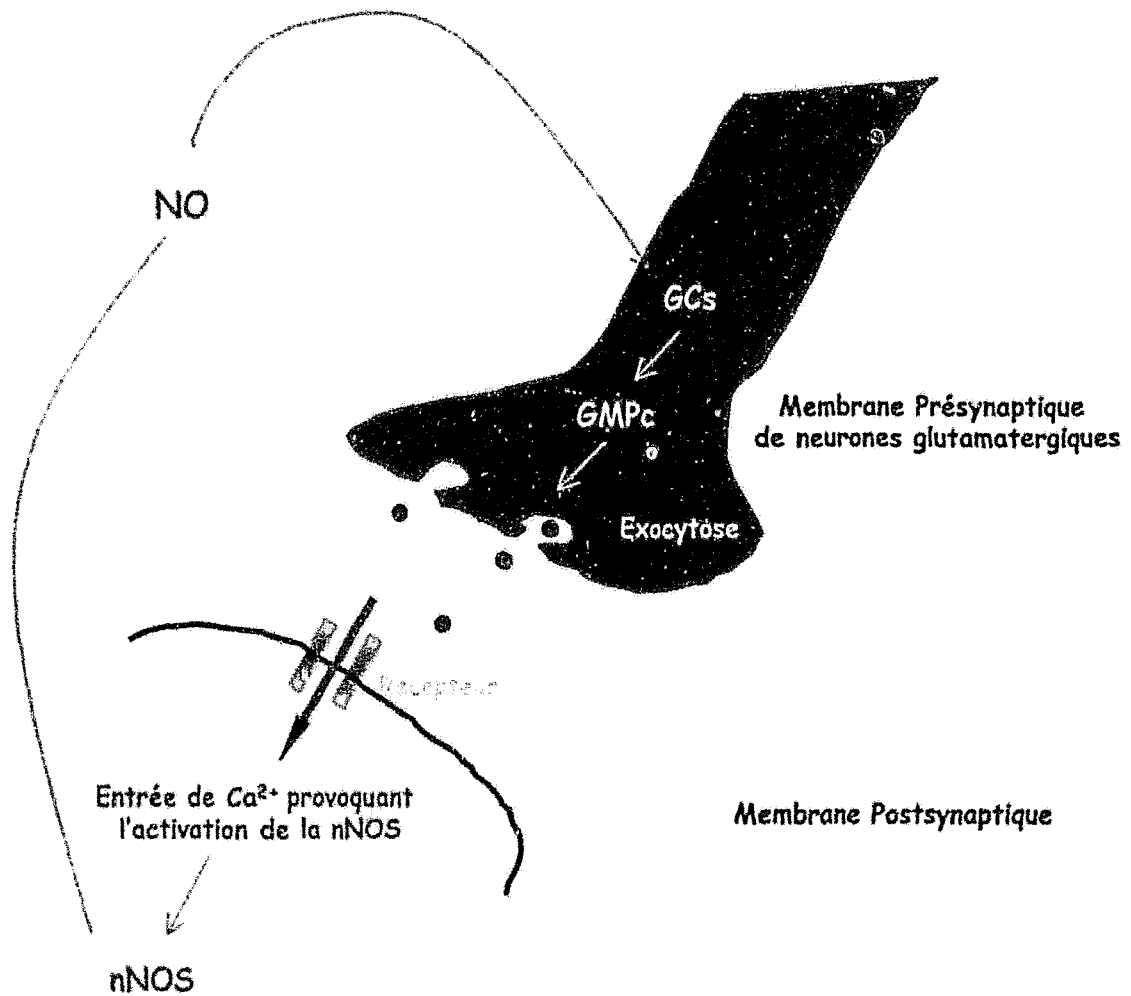


FIGURE 7. Représentation schématique de la voie Glutamate / Récepteur NMDA / NO mise en place notamment dans le phénomène de potentialisation à long terme. La libération de glutamate au niveau d'une synapse glutamatergique entraîne une activation du récepteur NMDA, provoquant l'entrée de Ca^{2+} au niveau de neurones présynaptiques exprimant la nNOS. L'activation de la nNOS provoque une synthèse et une libération de NO aboutissant à la stimulation de la guanylate cyclase soluble (GCs) au niveau des neurones présynaptiques. Le GMPC ainsi formé va stimuler la libération de glutamate. Le système va dès lors fonctionner en boucle.

passerait par le NO (Bitran *et al.*, 1999) puisque: 1) le NPY serait capable d'entraîner une libération de NO ; 2) l'effet inhibiteur du NPY est aboli en présence d'un inhibiteur de NOS, le L-NMMA. L'action stimulatrice du NPY sur la libération de NO se retrouve également au niveau des artères cérébrales de rat : l'endothélium des vaisseaux possède les récepteurs Y1 et Y2 au NPY, et leurs activations aboutissent à une libération de NO nécessaire à la vasodilatation (You *et al.*, 2001).

L'activation des NOS par la NA a été essentiellement démontrée au niveau hypothalamique. Canteros *et al.* (1996) ont constaté que l'incubation d'explants d'hypothalamus médiobasal en présence de NA augmente l'activité NOS, dosée par conversion de [¹⁴C]L-Arg en [¹⁴C]Citrulline. Cet effet est bien spécifique de la NA car il est antagonisé par la prazosine qui bloque les récepteurs $\alpha 1$ -adrénergiques. Il semblerait qu'un tel phénomène se retrouve au niveau de l'artère thoracique : la NA pourrait stimuler la libération de NO via des récepteurs $\alpha 1$ et $\alpha 2$ localisés au niveau des cellules endothéliales (Chen *et al.* 1994).

11) NO et système à GnRH

a) nNOS et GnRH

L'activité sécrétoire des neurones à GnRH semble être étroitement liée à l'activité NOS, et de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont démontré l'implication du NO dans le contrôle de la sécrétion de la GnRH (Rettori *et al.* 1993, 1994).

Dans le cerveau du rat, la grande majorité des cellules neuronales exprimant la nNOS sont localisées dans l'hypothalamus (Bredt *et al.*, 1991 ; Schuman et Madison, 1994), en particulier dans l'APO, au niveau de laquelle ces cellules entourent les corps cellulaires des

neurones à GnRH (Herbison *et al.*, 1996). Le contrôle de l'activité des neurones à GnRH par le NO peut s'effectuer : 1) au niveau de leurs corps cellulaires localisés dans l'APO, et 2) au niveau des terminaisons neuroendocrines dans l'EM.

Au niveau de l'APO médiane, Pu *et al.* (1996) ont pu mesurer les taux de GMPc extracellulaire par microdialyse. La mesure de cette sécrétion de GMPc dans une région bien précise du cerveau est un index de la sécrétion basale ou provoquée de NO. Cette étude, réalisée chez des rats mâles et femelles, a permis de démontrer l'existence d'une sécrétion de NO / GMPc stéroïdo-dépendante. Le rôle du NO à ce niveau reste inconnu. Pu *et al.* (1996) supposent que ce NO va activer d'autres systèmes neuronaux intervenant dans le contrôle de l'activité des neurones à GnRH, comme c'est le cas du NPY. Seule une étude récente de Kohsaka *et al.* (1999) utilisant la technique de push-pull perfusion a montré que la L-Arg entraînait une augmentation des libérations de GMPc et de GnRH au niveau de l'APO médiane. D'un point de vue génomique, un travail de Belsham *et al.* (1996), réalisé sur des lignées cellulaires hypothalamiques GT1, semble indiquer que le NO pourrait réprimer la transcription du gène de la GnRH.

Au niveau de l'EM, l'immunoréactivité pour la nNOS est détectée au niveau de la zone interne (Herbison *et al.*, 1996 ; Yamada *et al.*, 1996), par opposition aux terminaisons à GnRH qui se projettent au niveau de la zone externe. Concernant l'identité des populations cellulaires qui expriment la nNOS à ce niveau, deux études se contredisent : la première n'implique que les cellules neuronales (Herbison *et al.*, 1996), la seconde démontre l'existence de neurones et de cellules gliales nNOS immunoréactives (Kawakami *et al.*, 1998b).

b) Immunoréactivité eNOS

Par opposition à la nNOS, l'immunoréactivité pour l'eNOS a été détectée au niveau des cellules endothéliales des capillaires portes hypophysaires localisés dans la zone externe de l'EM, à proximité des terminaisons neuroendocrines (Prevot *et al.*, 2000b) (FIGURE 8).

c) NO et libération de la GnRH au niveau de l'EM

De nombreuses études ont mis en évidence l'importance du rôle du NO dans le contrôle de la sécrétion de la GnRH dans l'EM. Les auteurs ont tout d'abord cherché à bloquer la synthèse de NO dans des conditions *in vivo* et *in vitro* : ainsi, l'injection i.c.v. d'inhibiteurs des NOS empêche la sécrétion basale de GnRH / LH chez le rat mâle (Rettori *et al.*, 1992), mais également la survenue du pic préovulatoire de GnRH / LH chez des rates ovx et supplémentées en œstradiol et progestérone (Bonavera *et al.*, 1993,1994). En outre, l'infusion de L-Arg au niveau de la région EM-noyau arqué de rat stimule la libération de GMPC, accompagnée d'une augmentation de la libération de la GnRH. L'importance du NO dans ce système est renforcée par les travaux d'Aguan *et al.* (1996). En effet, les i.c.v. d'oligonucléotides anti-sens NOS, qui vont bloquer la traduction des ARNm codant pour les NOS, atténuent le pic préovulatoire de GnRH / LH induit chez des rates ovx supplémentées en œstradiol et progestérone.

Comme nous l'avons vu précédemment, le NO va activer la GCs et la COX présentes dans les terminaisons nerveuses des neurones à GnRH, ce qui aboutit à une synthèse de GMPC et de PGE₂, entraînant ainsi la libération de la GnRH dans les capillaires du système porte.

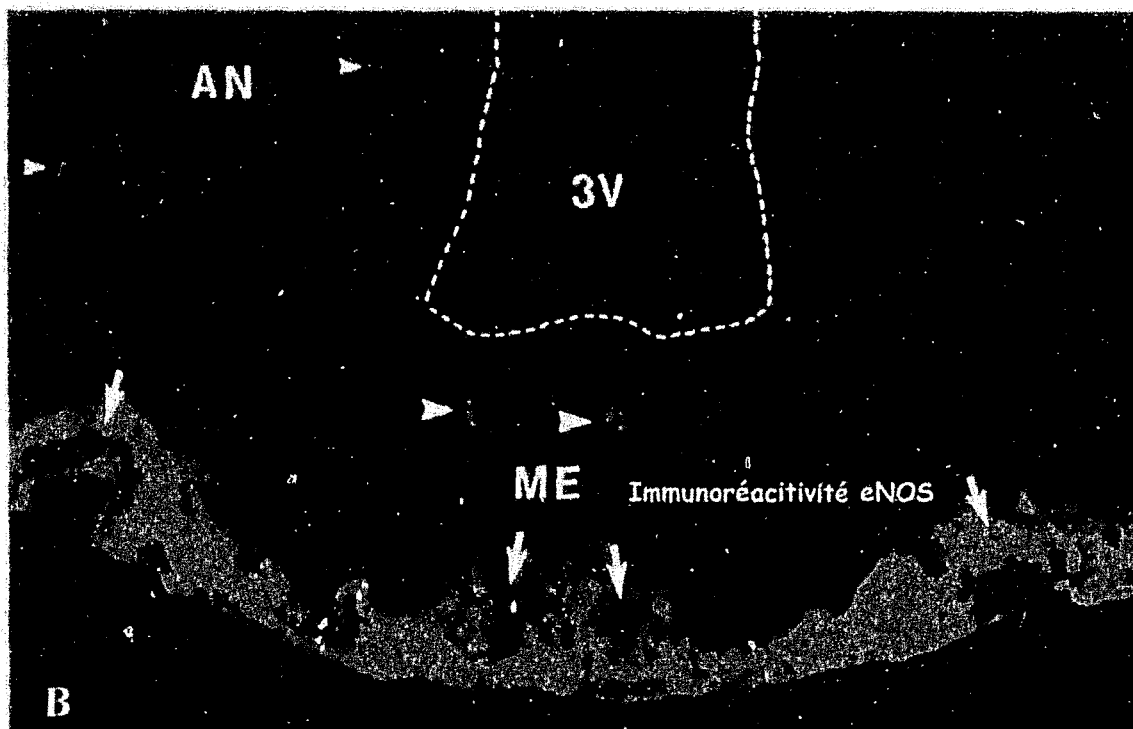
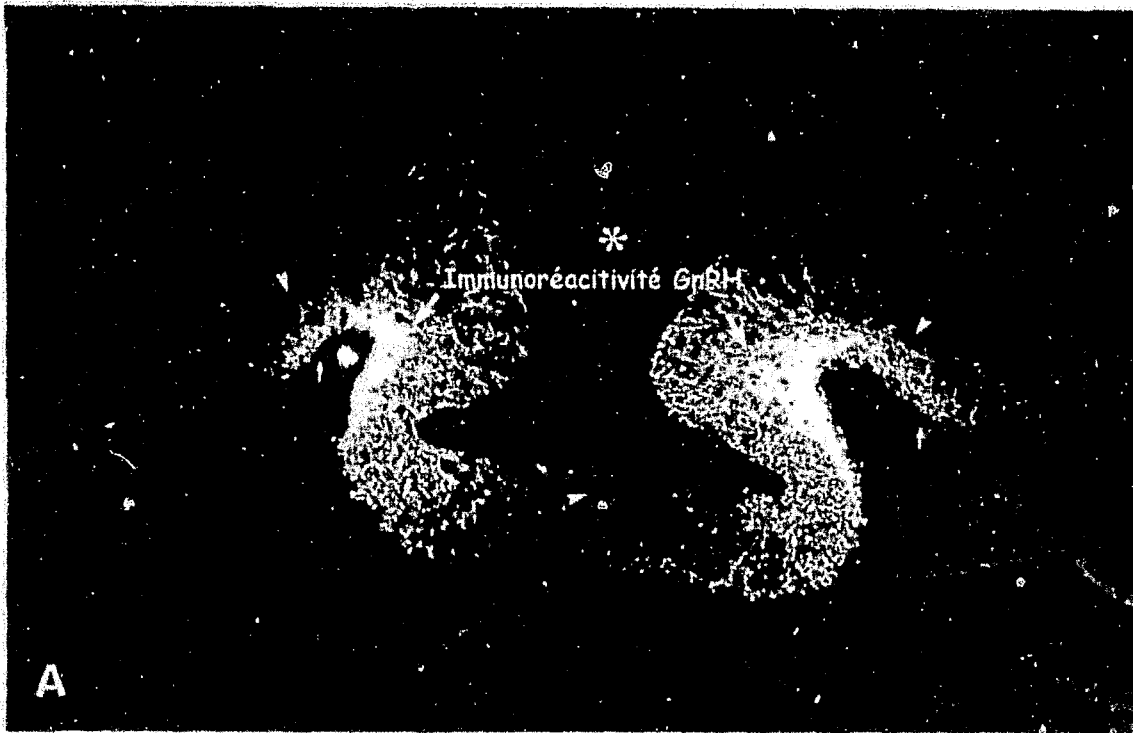


FIGURE 8. A. Photographie d'une coupe frontale d'EM de rat. La GnRH est détectée par immunofluorescence et se retrouve au niveau de la zone externe de l'EM. B. Photographie d'une coupe frontale d'EM de rat montrant l'immunoréactivité eNOS dans les vaisseaux portes au niveau de la zone externe (d'après Prevot *et al.*, 2000). ME: éminence médiane, AN: noyau arqué, 3V: 3^{ème} ventricule. Agrandissement x200.

d) NO et cellules GT1

La lignée cellulaire immortalisée GT1 exprime, contrairement aux neurones à GnRH (Grossman, 1994 ; Herbison *et al.*, 1996), les ARNm et les protéines codant pour les trois types de NOS (Mahachoklertwattana *et al.*, 1994 ; Lopez *et al.*, 1997). Par ailleurs, pour ces cellules, l'activité NO est cruciale à la genèse de la sécrétion pulsatile de GnRH (Lopez *et al.*, 1997).

12) Libération du NO au niveau de l'EM : origines possibles

Comme le NO est apparemment un élément crucial au bon déroulement de la sécrétion *in vitro* et *in vivo* de la GnRH et que les explants d'EM sont capables de libérer la GnRH selon un mode pulsatile (Rasmussen, 1993), l'origine *in vivo* du NO au niveau de l'EM reste à déterminer.

La iNOS n'étant présente qu'au niveau de tissus lésés ou que chez des animaux âgés (Vernet *et al.*, 1998), le NO impliqué dans la libération de la GnRH dans l'EM pourrait avoir deux origines : neuronale et / ou endothéliale.

a) Origine neuronale

L'hypothèse d'une origine neuronale du NO impliqué dans la libération de la GnRH est avancée essentiellement par le groupe de McCann. Dès les années 80, leurs travaux ont permis de montrer toute une cascade d'événements (Introduction, I, *Chapitre 5*) partant de l'activation de récepteurs adrénergiques de type $\alpha 1$ par la NA et par la production de PGE_2 ,

aboutissant à une libération de GnRH par un mécanisme AMPc dépendant (Ojeda *et al.*, 1979, 1986 ; Negro Vilar *et al.*, 1986). L'action stimulatrice de la NA sur la synthèse de PGE₂ fait intervenir des interneurons NOergiques : en effet, le L-NMMA bloque la libération de PGE₂ NA-dépendante (Rettori *et al.*, 1992). En résumé, l'activation de récepteurs α_1 provoquerait une réaction en cascade : augmentation de la concentration en Ca²⁺ intracellulaire, stimulation de la nNOS, synthèse de NO, activation de la COX et de la GCs dans les neurones à GnRH, libération de GnRH.

Le NO, dont la synthèse a été stimulée par la NA, va également inhiber la sécrétion de GnRH. Le NO est capable de provoquer une libération de GABA, qui va inhiber la libération de GnRH (Seilicovich *et al.*, 1995). Il se met alors en place une véritable boucle de régulation, avec le NO en position central : les différents éléments neuromodulateurs (NA, GABA, β -endorphine, glutamate, galanine) vont pouvoir interagir entre eux et / ou avec les neurones NOergiques pour moduler la libération de la GnRH (FIGURE 9).

b) Origine endothéliale

Certains arguments sont en faveur d'un rôle important de l'eNOS dans le contrôle de la sécrétion de GnRH.

En effet, les injections i.c.v. d'oligonucléotides antisens de la eNOS sont plus efficaces que les oligonucléotides antisens de la nNOS pour empêcher la survenue du pic préovulatoire de GnRH / LH induit chez les rates ovx supplémentées en œstradiol et progestérone (Aguan *et al.*, 1996). Une étude réalisée au laboratoire (Prevot *et al.*, 1999b) a montré que des fragments d'EM de rats mâles maintenus en survie, libèrent rapidement du NO en réponse à l'apport exogène de 17- β œstradiol. Ce NO stimule en retour la libération de GnRH dans le milieu de survie. Ce processus, antagonisé par le tamoxifène, est médié par des récepteurs spécifiques

Les différents récepteurs:
 α : récepteur alpha noradrénergique
 μ : récepteur mu aux opioïdes
 NMDA-R1: récepteur au glutamate
 KA2: récepteur au glutamate type kainate
 Y1: récepteur au NPY

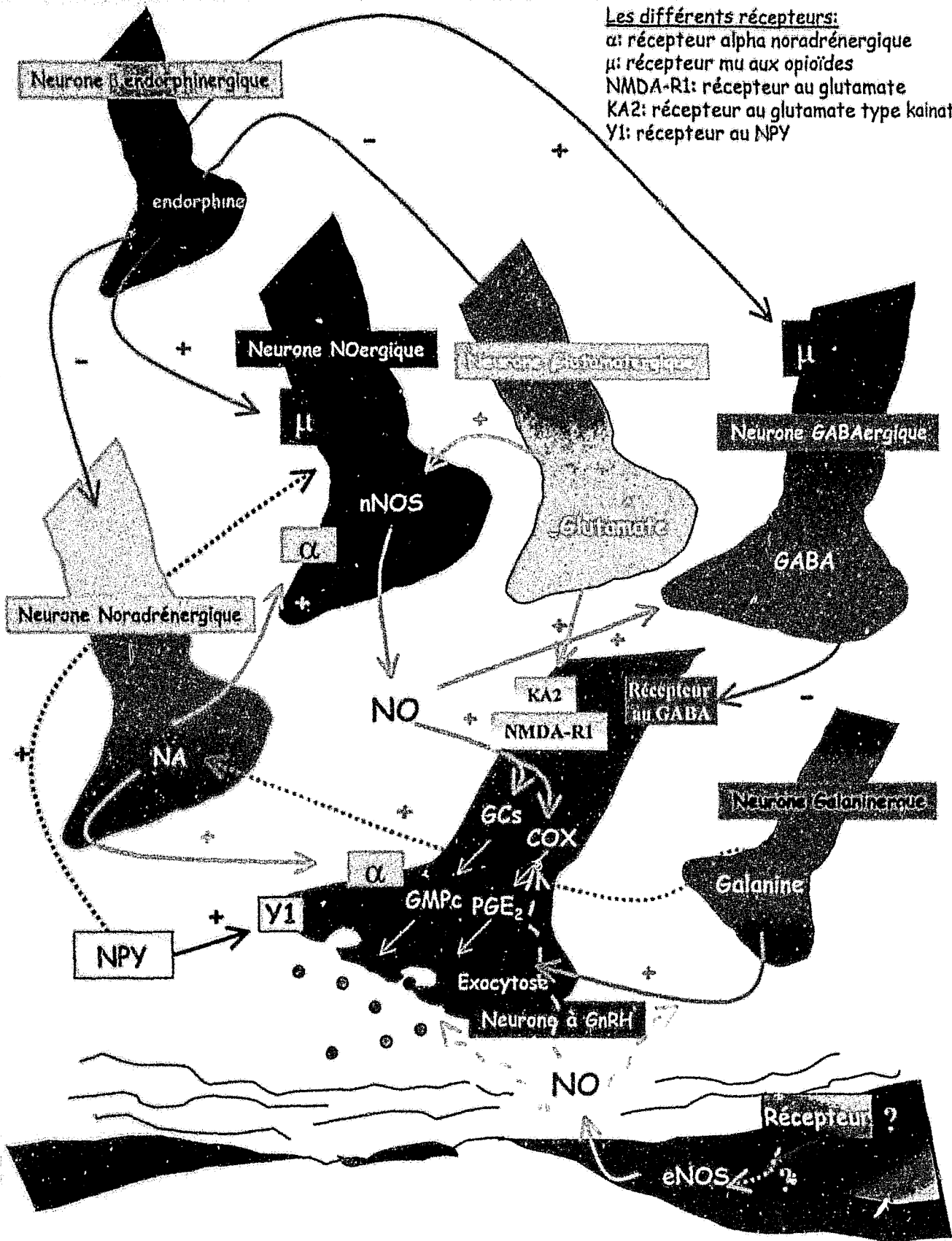


FIGURE 9. Représentation schématique des interactions entre les neurones à GnRH et les différents facteurs d'origine neuronale à savoir: le monoxyde d'azote (NO), la noradrénaline (NA), le neuropeptide Y (NPY), le glutamate, l'acide γ -aminobutyrique (GABA), la galanine et la β -endorphine. Dans l'EM, les enzymes clés de la synthèse du NO ont deux origines: une neuronale ou Nitric Oxide Synthase neuronale (nNOS), l'autre endothéliale ou eNOS. Alors que les relations entre la nNOS et d'autres éléments neuronaux sont très complexes et très étudiées, la part de la eNOS dans le contrôle des neurosécrétions est totalement inconnue.

au 17- β œstradiol. Ce travail a également été l'un des premiers à montrer l'existence d'une action membranaire de l'œstradiol dans l'EM. De plus, cet effet de l'œstradiol est diminué en présence de L-NIO (L-N⁵-(1-iminoethyl)ornithine) à 5.10⁻⁷M (concentration efficace pour inhiber préférentiellement l'eNOS, Rees *et al.*, 1990). Il en résulte alors une hypothèse : l'endothélium pourrait avoir une influence considérable dans la libération de neurohormones via la synthèse de NO (FIGURE 9).

D'une façon générale, l'importance de l'eNOS dans la physiologie de la reproduction est renforcée par les travaux de Jablonka-Shariff *et al.* (1999). Ainsi, les souris knock-out (KO) pour le gène de l'eNOS présentent des perturbations de leur cycle œstral : le diœstrus et l'œstrus sont augmentés, et le cycle dure alors 6 à 7 jours au lieu de 4. En plus de ces troubles, ces animaux présentent une morphologie ovarienne anormale, un taux d'ovulation plus bas que les animaux de type sauvage, ainsi qu'une stéroïdogénèse élevée.

III / Objectifs de la thèse

Ce travail bibliographique démontre l'importance du NO dans la libération de la GnRH au niveau de l'EM. Cependant, nous constatons que les résultats restent très fragmentaires et souvent contradictoires. Il n'est d'ailleurs pas exclu que les deux types de NOS constitutives soient impliqués, probablement dans des proportions différentes.

Par ailleurs, il est actuellement impossible de comprendre l'importance physiologique du NO sécrété par l'EM, car la majorité des résultats ont été obtenus dans des conditions expérimentales.

Compte tenu de ces interrogations, nos objectifs essentiels ont été de donner des éléments nouveaux sur l'origine du NO intervenant dans la régulation de la sécrétion de la GnRH par l'EM et de rechercher si ce NO était véritablement impliqué au cours du cycle œstral, et notamment au moment du pic préovulatoire.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

I / Etudier le mode de sécrétion du NO au niveau de l'EM

- 1) Déterminer si a) des EM de rates maintenues en survie libèrent spontanément du NO, b) si la libération de NO varie au cours du cycle œstral et c) apprécier son implication sur la sécrétion de la GnRH
- 2) Etudier l'influence des stéroïdes sur le système NO / GnRH
- 3) Déterminer l'origine du NO mesuré

II / Etudier les variations de la eNOS dans l'EM au cours du cycle œstral et vérifier l'influence des stéroïdes sur l'expression de l'enzyme

- 1) Etude par RT-PCR et Western Blot de l'eNOS
- 2) Etude par Western Blot des variations de la cav-1

III / Implication des neuropeptides de l'EM sur la libération spontanée de NO

- 1) Implication des récepteurs Y1 et Y2 au NPY dans la sécrétion spontanée de NO : conséquences sur la libération de la GnRH
- 2) Influence de la galanine sur la libération de NO : conséquences sur la libération de la GnRH

RESULTATS

RESULTATS

I / Etude du mode de sécrétion du NO au niveau de l'EM : Implication sur la sécrétion de la GnRH, rôle des stéroïdes, origine du NO mesuré

L'importance du NO dans le contrôle de la sécrétion de la GnRH au niveau de l'EM est parfaitement établi (Rettori *et al.*, 1993, 1994). Concernant l'origine de ce NO, l'implication de la NOS neuronale dans la régulation du système à GnRH a été avancée précédemment par l'équipe de McCann (voir Introduction, II, *Chapitre 12*). Inversement, le rôle possible de la NOS d'origine endothéliale dans le fonctionnement de ce système n'avait alors pas été envisagé. Cependant, il existe une immunoréactivité pour la eNOS très importante au niveau de la zone externe de l'EM (Prevot *et al.*, 2000b), région où se situent la grande majorité des terminaisons nerveuses des neurones à GnRH.

Une étude au laboratoire (Prevot *et al.*, 1999b) a permis de démontrer que des fragments d'EM de rats mâles maintenus en survie libéraient du NO en réponse à l'apport exogène de 17 β -œstradiol dans le milieu. Cette sécrétion de NO se ferait via l'activation de récepteurs membranaires à l'œstradiol localisés à la surface des cellules endothéliales des capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire. Il s'est alors posé la question de savoir si l'endothélium pouvait jouer un rôle dans les conditions «normales», physiologiques, que l'on peut observer au cours du cycle œstral.

Compte tenu de ces données, le premier objectif de ce travail de thèse a été d'étudier la libération du NO au niveau de l'EM. Ce travail s'est déroulé en trois temps :

1) Nous avons essayé de savoir si des fragments d'EM de rates maintenus en survie libèrent spontanément du NO, sans ajout de substances, et donc dans des conditions proches de la physiologique. Cette étude a été entreprise sur des EM de rates cyclées et sacrifiées à différents jours et heures du cycle œstral, correspondant aux différentes étapes d'imprégnation hormonale. Les animaux présentant des anomalies au niveau de leur cycle œstral ou au niveau de leurs taux en stéroïdes gonadiques circulants ont été écartés de l'étude. L'utilisation de sondes ampérométriques détectant spécifiquement le NO (Malinski et Taha, 1992) nous a permis de mesurer directement les taux de NO sécrétés par les EM plongées dans le milieu de survie. Ces sondes sont constituées : 1) d'une membrane en Nafion perméable uniquement au gaz, et 2) d'une fine couche de porphyrines polymérisées au niveau de laquelle le NO sera oxydé. La réaction d'oxydoréduction, qui se produit au niveau de l'électrode en présence du NO, va créer un courant électrique, directement proportionnel à la concentration en NO. Ce courant sera transformé en signal, visualisé sur ordinateur et enregistré en temps réel. Cette technique est l'une des seules permettant de mesurer directement ce gaz, sans passer par des molécules intermédiaires résultant d'une activité NOergique. Les pics de NO obtenus sont transférés dans différents logiciels d'analyse (Duo18, Sigma Plot) pour obtenir leurs principales caractéristiques, à savoir : amplitude maximale, durée, aire, période entre deux pics. Après une période d'incubation de 30 minutes correspondant au temps d'adaptation de la sonde, les mesures ampérométriques sont réalisées pendant 2 heures. Toutes les 30 minutes, le milieu est prélevé et remplacé par du milieu frais en vue de doser la GnRH par dosages radioimmunologiques (RIA).

2) Ensuite, afin de vérifier l'importance des stéroïdes dans le système NO / GnRH, des rates ont été ovariectomisées (ovx), ovx supplémentées en 17β -œstradiol seule, et ovx supplémentées en œstradiol et progestérone. Les protocoles expérimentaux utilisés ici sont similaires à ceux de Bonavera *et al.* (1993).

3) Enfin, pour vérifier l'éventuelle participation de l'endothélium dans le contrôle de la sécrétion spontanée de NO, nous avons utilisé le L-NIO, inhibiteur préférentiel de la eNOS à $5.10^{-7}M$, dans les conditions maximales de mesures de NO / GnRH, correspondant au stade proestrus 1600h.

Ces travaux sont présentés dans le premier article paru dans *Endocrinology* (2001, 142(6) : 2343-2350).

**Evidence for a spontaneous nitric oxide release from the rat median eminence :
Influence on gonadotropin-releasing hormone release**

Claude Knauf, Vincent Prevot, George B. Stefano, Geneviève Mortreux,
Jean-Claude Beauvillain, and Dominique Croix

Endocrinology, 2001, 142(6):2343-2350

Evidence for a Spontaneous Nitric Oxide Release from the Rat Median Eminence: Influence on Gonadotropin-Releasing Hormone Release*

CLAUDE KNAUF, VINCENT PREVOT, GEORGE B. STEFANO,
GENEVIEVE MORTREUX, JEAN-CLAUDE BEAUVILLAIN, AND DOMINIQUE CROIX

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U422 (C.K., V.P., G.M., J.-C.B., D.C.), IFR22, Unité de Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuronale, 59045 Lille Cedex, France; Neuroscience Research Institute (G.B.S.), State University of New York, Old Westbury, New York 11568; and the Division of Psychiatry (G.B.S.), Harvard Medical School, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts 02115

ABSTRACT

The involvement of nitric oxide (NO) as a gaseous neurotransmitter in the hypothalamic control of pituitary LH secretion has been demonstrated. NO, as a diffusible signaling gas, has the ability to control and synchronize the activity of the neighboring cells. NO is secreted at the median eminence (ME), the common termination field for the antehypophysiotropic neurons, under the stimulation of other signaling substances. At the ME, NO stimulates GnRH release from neuroendocrine terminals. The present studies were undertaken to determine whether NO is secreted spontaneously from ME fragments *ex vivo* and whether its secretion is correlated to GnRH release. To accomplish this, female rats were killed at different time points of the day and/or of the estrous cycle. The spontaneous NO release was measured in real time, with an amperometric probe, during 4 periods of 30 min, from individual ME fragments (for each time point, $n = 4$). GnRH levels were measured in parallel for each incubation period by RIA. The results revealed that NO was released in a pulsatile manner from female ME fragments and, unambiguously, that the amplitude of NO secretion varied markedly across the estrous cycle. Indeed, though the NO pulse period (32 ± 1 min, $n = 36$) and duration (21 ± 2 min, $n = 36$) did not vary significantly across the estrous cycle, the

amplitude of this secretion pulse was significantly higher on proestrus (Pro; 39 ± 3 nM, $n = 20$), compared with diestrus (16 ± 1 nM, $n = 8$) or estrus (23 ± 3 nM, $n = 8$, $P < 0.05$). The GnRH levels in the incubation medium were positively correlated to NO secretion across the estrous cycle ($r = 0.86$, $P < 0.003$, $n = 9$), confirming that NO and GnRH release are coupled. Furthermore, 5×10^{-7} M L-N^G, (1-iminoethyl)ornithine (L-NIO), a NO synthase inhibitor, succeeded in inhibiting the strong NO-GnRH secretory coupling and GnRH release on Pro. Because at this concentration, L-NIO selectively inhibits endothelial NO synthase, the results further demonstrate that the major source of NO involved in GnRH release at the ME is endothelial in origin. Additionally, the induction of a massive NO/GnRH release in 15-day ovariectomized rat treated with estradiol benzoate strongly suggested that estradiol is participating in the stimulation of NO release activity between diestrus II and Pro. The present study is the first demonstrating that ME can spontaneously release NO and that NO's rhythm of secretion varies markedly across the estrous cycle. This pulsatile/cyclic ME NO release may constitute the synchronizing link to anatomically scattered GnRH neurons. (*Endocrinology* 142: 2343–2350, 2001)

NITRIC OXIDE (NO) is a gaseous signal molecule that exerts multiple physiological and pathological actions in a variety of tissues (1), including the brain (2). Indeed, NO may act as a neurotransmitter that simply diffuses from nerve terminals upon its release (3). NO formed by oxidation of L-arginine to L-citrulline is synthesized either by constitutive NO synthases (NOS), neuronal-type NOS I (nNOS), and endothelial-type NOS III (eNOS) or by the inducible NOS II (iNOS) (4). Constitutive NOS are regulated by calcium (Ca^{2+}) and calmodulin (5, 6), whereas iNOS, binding calmodulin tightly, is not regulated by Ca^{2+} (7, 8). Furthermore, iNOS can be induced in macrophages and many other cells with bacterial lipopolysaccharides and/or cytokines (9, 10).

Received September 5, 2000.

Address all correspondence and requests for reprints to Vincent Prevot, Oregon Regional Primate Research Center/Oregon Health Science University, 505 Northwest 185th Avenue, Beaverton, Oregon 97006. E-mail: vincentp@ohsu.edu.

* This work was supported by DA Grant 09030 and NIH Fogarty Grant INT-00045 (to G.B.S.), the University of Lille II, the FEDER (Lille-Amiens-Rouen-Cen network), the Centre Hospitalier Régional et Université de Lille, and the Région Nord-Pas-De-Calais.

NO has been implicated in reproductive functions and behaviors, including ovulation, oocyte meiotic maturation (11), estradiol (E_2)-synthesis (12), lordosis, and penile erection (13). NO also participates in the control of GnRH/LH release by modulating GnRH neurons activity at the hypothalamus (14–17). At the preoptic area, the close anatomical interrelation between nNOS-immunoreactive cells and the GnRH perikarya (18) supports the speculation of NO controlling GnRH cell body activity. At the median eminence (ME), projection site of the GnRH neurons, NO stimulates GnRH release from the GnRH neuroendocrine terminals located within the ME external zone (15). The fact that intracerebroventricular injections of NOS inhibitors or antisense oligonucleotides inhibit the GnRH/LH secretory activity (15, 19) suggests that NO plays a major role in the control of the GnRH neuroendocrine axis and thus in reproductive functions (14).

Ex vivo studies on ME or mediobasal hypothalamus fragments demonstrated that NO exerts at least part of its stimulatory effect on GnRH release by acting directly on GnRH nerve terminals (15–17). NO might target either the guanylyl

cyclase (16, 20, 21) or the cyclooxygenase (22) within the GnRH nerve terminals. These enzymes generate cyclic GMP (cGMP) and $PG E_2$ formation. Induction by cGMP of a cationic conductance (23) stimulates a depolarization from neuroendocrine terminals that leads to GnRH release (24), whereas $PG E_2$ enhances the mobilization of Ca^{2+} from intracellular stores (25) and cAMP formation (26) that induces the exocytosis of GnRH secretory granules (22). Thus, known NO signaling cascades can account for the reported pharmacological actions of this signaling molecule.

Within this last decade, many studies have attempted to identify the endogenous neuroendocrine pathways involved in the control of NO-stimulated GnRH release. However, little is known about the origin of NO locally produced at the ME, and nothing is known about its pattern of secretion. Given that nNOS is undetectable in the hypothalamus under normal conditions, we surmise that NO is synthesized in the ME by a constitutive eNOS (20, 27) because, by definition, it is always present. In this regard, nNOS is detected in fibers located in the internal zone of the ME projecting to the neurohypophysis (28), and eNOS has been located in endothelial cells situated very close to the neuroendocrine GnRH terminals of the ME external zone (28). In previous reports, we demonstrated that at the ME, the NO of vascular origin is able to modulate hypothalamic neurosecretions, *i.e.* GnRH release (20, 27). The aim of the present study is to determine whether, under physiological and experimental circumstances, we are able to detect NO secretion from ME fragments without the need for exogenous stimulatory substances, by using the amperometric method for NO detection. This study provides compelling evidence for the importance of the vascular endothelium in the control of GnRH release.

Materials and Methods

Female Wistar rats (CERJ, St. Berthevin, France), weighing 250–300 g, were housed in cages on a 1200 h–1200 h light-dark cycle and temperature (23–25°C)-controlled room with free access to food and water. All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC).

Exp 1: analysis of spontaneous NO release from ME fragments throughout the rat estrous cycle

Vaginal lavage of female rats was examined daily, and only rats that exhibited at least 2 consecutive 4-day estrous cycles were used for the present experiment. Female rats were killed by decapitation at 0800 h and 1400 h on diestrus II (DII), at 0800 h, 1400 h, 1600 h, 1700 h, and 1800 h on proestrus (Pro), and at 800 h and 1400 h on estrus (E). After rapid removal of the brain, the ME and associated vascular tissues were dissected under a binocular magnifying glass by cutting with Wecker's scissors (Moritz, France) the floor of the brain within the following limits: posterior border of the optic chiasma and the anterior border of the mammillary bodies, as described before (20). Following this dissection procedure, pieces containing ME were obtained with very little arcuate nucleus fragments. The total dissection time was less than 3 min from decapitation. After dissection, the ME fragments were washed twice in Krebs-Ringer bicarbonate/glucose buffer (pH 7.4) containing 23 μ M bicoumatin (Sigma, St. Louis, MO) in an atmosphere of 95% O_2 –5% CO_2 , and then immersed in Eppendorf tubes containing 500 μ l of the same medium. Each tube contained one ME fragment. After a 30-min recovery period, the medium was changed, and then the spontaneous NO release was measured at 35°C for 4 periods of 30 min by using a NO-specific amperometric probe (World Precision Instruments, Sarasota, FL) as

previously described (20, 27). At the end of each 30-min incubation period, 600 μ l of medium was removed and replaced with 600 μ l of fresh Krebs-Ringer bicarbonate/glucose buffer. EDTA (10^{-2} M final) was added to the removed medium. Because the amperometric probe requires at least a 5-min recovery period after each change of medium, we were unable to shorten the intervals of sample collection without negatively affecting the real-time NO release data acquisition. Each sample was stored at -20°C before analysis of the GnRH levels in the medium. The tip diameter of the amperometric probe (25 μ m) used to monitor NO secretion permitted the use of a micromanipulator (Carl Zeiss-Eppendorf, Hamburg, Germany) to position the sensor 5 mm above the tissue surface. Calibration of the electrochemical sensor was performed by the use of different concentrations of a nitrosol donor *S*-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (Sigma), as previously described in detail (29). The concentration of NO gas in solution was measured in real-time with data acquisition (DUO 18, World Precision Instruments) at a sampling rate of 6/sec (20). The computer-interfaced DUO-18 software (World Precision Instruments) performed data acquisition. The experimental values were then transferred to Sigma-Plot and Sigma-Stat (Jandel, San Rafael, CA) for graphic representation and evaluation.

Exp 2: effect of an eNOS selective inhibitor on NO/GnRH release from Pro 1600 ME fragments

To assess whether the major source of NO secreted at the ME is, as suggested by our previous studies (20, 27), mainly endothelial in origin, rather than neuronal, we treated Pro 1600 ME fragments with *L*-N^G-(1-iminoethyl)ornithine (*L*-NIO) at 5×10^{-7} M. At this concentration, *L*-NIO selectively inhibits the eNOS activity (30) and suppresses the NO-induced GnRH release from male ME fragments in the *in vivo* (20). The ME fragments were processed as described above. The *L*-NIO was added after the washes throughout the whole incubation period.

Exp 3: effect of ovarian steroids on ME NO release

Twelve animals were bilaterally ovariectomized (OVX) under ether anesthesia. The animals were divided in three groups: four animals were killed at 1400 h on the 17th day after OVX without receiving any treatment; four animals received a single sc injection of E_2 benzoate (E_2 B, 30 μ g/rat) at 1000 h on day 15 and were killed at 1400 h on day 17, and four animals received sc 30 μ g *E*-B at 1000 h on day 15 and 2 mg progesterone (P) at 1000 h on day 17 and were killed at 1400 h the same day. Amperometric measures of NO release were conducted as described above.

GnRH RIA

GnRH concentrations were measured in the medium for each 30-min incubation period for each animal of any experimental design, in duplicate by RIA, according to Nett and Adams' method (31), with minor modifications. Monoiodinated GnRH was isolated using a QAE Sephadex column. Antiserum raised to GnRH-HSA was produced in rabbit; and after absorption by HSA, it was used to a final dilution of 1:140,000. The sensitivity for GnRH was 1.2 pg/tube, and intraassay variability was 3.4%. The GnRH antibody was a gift from Dr. Tramou of the Centre National de la Recherche Scientifique URA 339, Université Bordeaux I (Talence, France).

Statistical analysis

All experiments were repeated a minimum of four times, *i.e.* a minimum of four animals was run for each experimental condition. Within the 2 h-long amperometric record obtained for each ME, the maximal amplitude of NO secretion for each one of the four 30-min incubation periods was taken into account and averaged. Similarly, for each experiment, the GnRH levels were determined by averaging the GnRH concentration of each 30-min incubation period sample. The mean NO/GnRH release for each time point of the estrous cycle or each experimental condition was reported on the different graphs (see Figs. 2–4). To facilitate the comparison of NO release during the different stages of the estrous cycle, the area under the curve (AUC) was calculated for each 30-min incubation period. All data are presented as the mean \pm SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA. Student's-Newman-Keuls multiple comparison (see Figs. 1 and 4)

TABLE 1. Pulsatility parameters for NO release from female rat ME maintained *ex vivo*

Estrous cycle stage	Period (min)	Duration (min)	NO peak maximal values (nM)	NO peak mean Amplitude (nM)
Di 0800	33 ± 3	14 ± 3	17 ± 2	4 ± 1
Di 1400	39 ± 4	18 ± 3	15 ± 3	6 ± 2
Pro 0800	29 ± 1 ^a	24 ± 2	33 ± 7	10 ± 4
Pro 1400	25 ± 2 ^a	18 ± 4	43 ± 7 ^a	19 ± 6
Pro 1600	30 ± 1	25 ± 3	54 ± 6 ^a	30 ± 10 ^a
Pro 1700	32 ± 1	23 ± 1 ^a	30 ± 3 ^a	17 ± 4
Pro 1800	31 ± 1	27 ± 2 ^a	17 ± 1	11 ± 3
E 0800	34 ± 2	15 ± 2	25 ± 4	9 ± 2
E 1400	30 ± 1	21 ± 2	22 ± 4	13 ± 4

^a Significantly different from Di 0800, $P < 0.05$, one-way ANOVA, Dunnett test.

was used just here to find significant differences between groups. A Dunnett test was performed to compare the data shown on Table 1. A Student's *t* test was used to compare the two different groups (see Fig. 3). To determine whether the GnRH levels monitored throughout the estrous cycle were linked to the NO levels, a Pearson product Moment Correlation was performed. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Analysis of spontaneous NO release from ME fragments throughout the rat estrous cycle

NO release from ME fragments was measured in real-time using an NO-specific amperometric probe at different stages of the estrous cycle without drug addition into the medium. The spontaneous NO release was monitored at the different time points of the estrous cycle (Fig. 1). NO efflux was pulsatile (Table 1), and its amplitude varied significantly across the estrous cycle (Figs. 1 and 2A). NO secretion was lowest on diestrus II. It increased significantly on the morning of Pro ($P < 0.05$) and reached a maximum on Pro 1600 h. At Pro 1800 h, the NO levels were significantly decreased ($P < 0.05$), and nadir levels were maintained through E (Fig. 2A). Noticeably, as illustrated in Fig. 1, the NO peak concentrations reached 30–50 nM on Pro, whereas they rarely exceeded 20 nM on diestrus and E.

Cycle NO and GnRH secretions during the estrous cycle are coupled

The collection of the incubation medium every 30 min demonstrated that the GnRH secretion from the neuroendocrine terminals located in the external zone of the ME followed a release profile identical to the one observed for NO secretion (Fig. 2B), i.e. the GnRH secretion was basal on diestrus II, increased on Pro, and reached a maximum on Pro 1600 h. On E, the GnRH levels were significantly lower, when compared with those on Pro 1600 h, but remained higher than on diestrus 0800 h. The Pearson product moment correlation test revealed that across the estrous cycle, the GnRH secreted levels were positively and strongly correlated to NO secretion (GnRH secreted vs. AUC: $r = 0.86$, $P < 0.003$, $n = 9$).

Selective inhibition of eNOS activity potently inhibits NO/GnRH release on Pro 1600 h

To test the hypothesis that the GnRH secretion from ME fragments observed on Pro was actually linked to NO

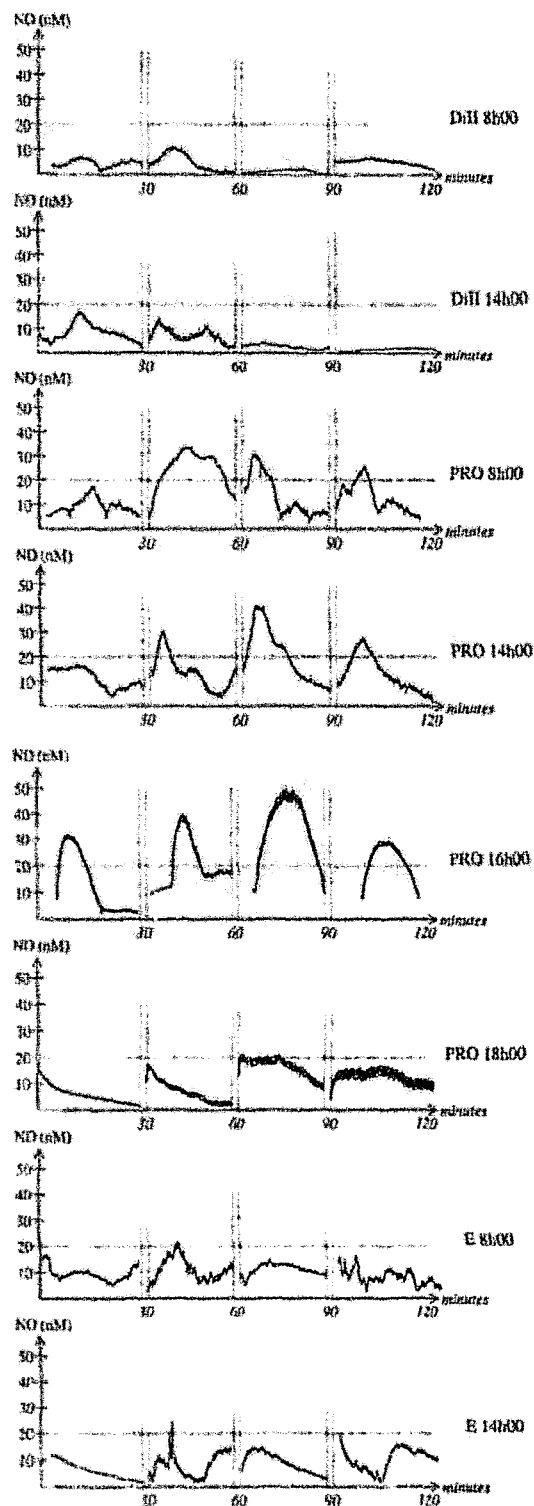


Fig. 1. Representative profiles of spontaneous NO secretion from ME fragments at different stages of the estrous cycle in the female rat. NO release was measured in real time, with an amperometric probe, for four periods of 30 min. After each 30-min period, the medium was changed (vertical bars). PRO, proestrus.

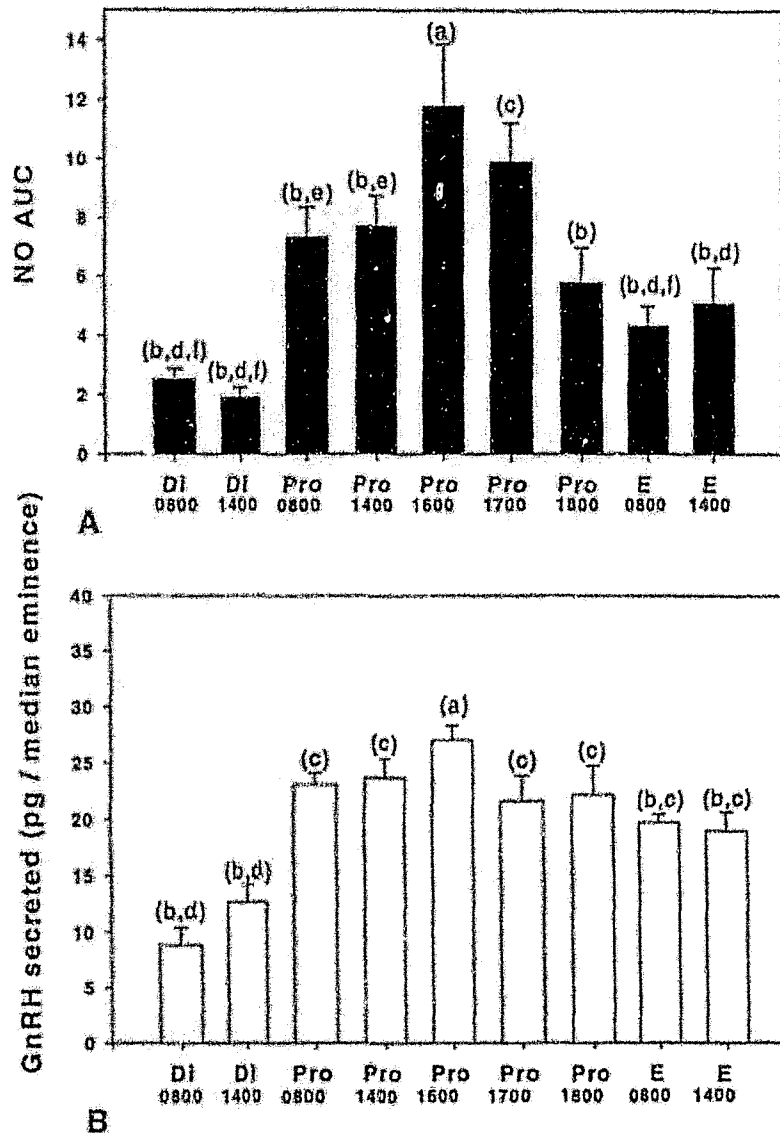


FIG. 2. Spontaneous NO (A) and GnRH (B) releases from female ME fragments throughout the estrous cycle. In this figure, the height of the column represents the mean, and the vertical line represents SEM. Significant differences ($P < 0.05$) among the average values for the different groups are noted as: a vs. b, c vs. d, and e vs. f.

secretion, we used L-NIO, a potent NOS inhibitor, to inhibit the spontaneous NOS activity in the ME. Additionally, we determined which NOS was involved in the spontaneous secretion of NO at the ME by using L-NIO at 5×10^{-7} M, a concentration that selectively inhibits eNOS (20, 30). The addition of 5×10^{-7} M L-NIO into the survival medium of Pro 16 h ME fragments significantly inhibited ($P < 0.01$) both the spontaneous NO secretory activity and GnRH release (Fig. 3). As found in Fig. 3, 5×10^{-7} M L-NIO did not totally suppress the ME NO release. In part, this may arise from the fact that 5×10^{-7} M L-NIO corresponds to the concentration required to produce 50% inhibition (IC_{50}) of eNOS (30) and is 10 times lower to the IC_{50} for nNOS (32), suggesting a limited level of nNOS activity and/or that a low level of eNOS activity remains in the ME fragments after L-NIO treatment (see Ref. 53).

E₂ treatment stimulates ME-fragment NO release in OVX rats (correlation with GnRH release)

To assess whether estrogen was involved in the increase of NO secretory activity between diestrus 1400 h and Pro 0800 h and to determine the role that progesterone may play in the regulation of GnRH/NO activity on Pro, OVX rats were either untreated or treated with E_2B , or E_2B followed by progesterone, and NO/GnRH release was monitored from ME fragments obtained from these animals. Two weeks after OVX, both the NO and GnRH effluxes from ME fragments were low and comparable with that monitored on diestrus II (Fig. 4). Forty-eight-hour treatment of OVX animals with E_2B resulted in a significant increase ($P < 0.05$) in NO secretion that was coupled with a significant increase in GnRH release ($P < 0.05$). In E_2B +progesterone-treated animals, the NO levels were higher than in untreated OVX rats, but not sig-

FIG. 3. Inhibition of the strong NO/GnRH release activity from Pro 1600 ME fragments by 5×10^{-7} M L-NIO, a selective inhibitor of eNOS. In this figure, the height of the bars represent the mean, and the vertical line represents SEM. *, Significantly different from the column without an asterisk, $P < 0.001$; a, significantly different from the corresponding column without a letter, $P < 0.01$.

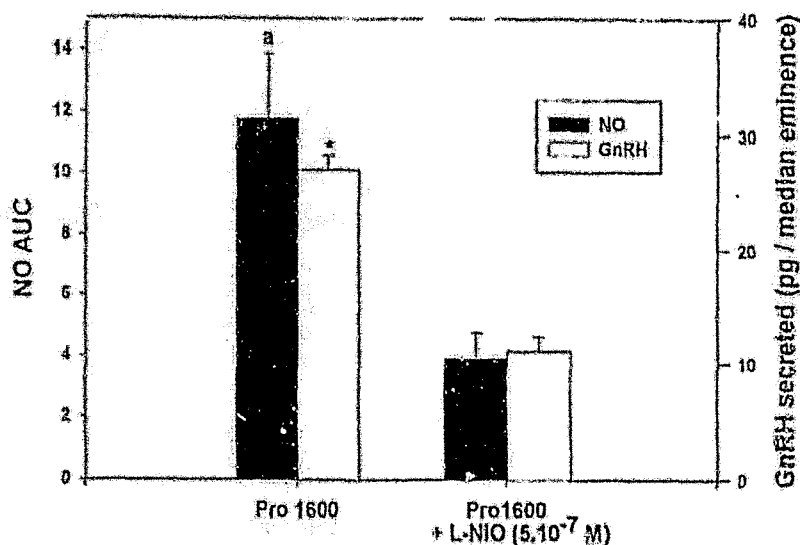
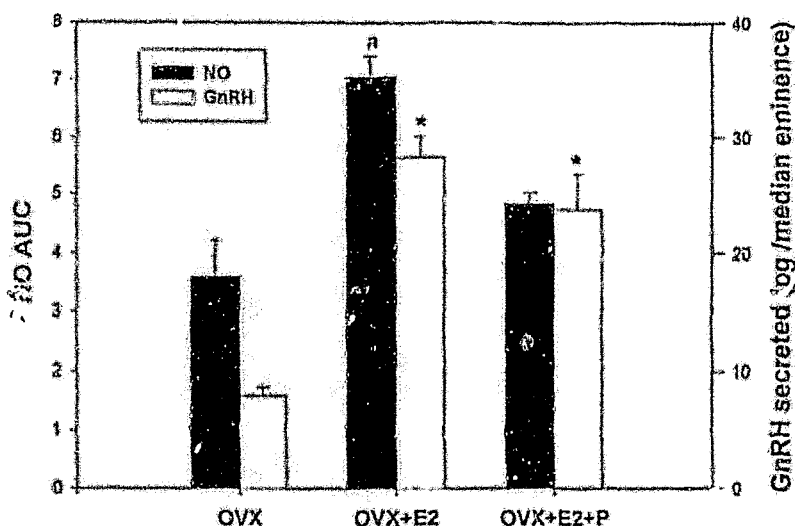


FIG. 4. Effect of ovarian steroid on NO/GnRH release from female ME fragments 2 weeks after OVX. In this figure, the height of the columns represents the mean, and the vertical line represents SEM. *, Significantly different from the column without an asterisk, $P < 0.001$; a, significantly different from the corresponding column without a letter, $P < 0.01$.



nificantly different, whereas GnRH secreted levels were significantly higher ($P < 0.05$).

Discussion

The present study demonstrates that isolated female rat ME fragments spontaneously release NO in an episodic pattern. NO effluxes are found to vary markedly across the estrous cycle, and they seem to be cyclic. Thus, NO secretion is the lowest during diestrus II, increases by 300% on 0800 h Pro, and reaches a maximum on 1600 h Pro. The high levels of NO are maintained until 1800 h Pro. Notably, increases of NO secretion during the estrous cycle are positively correlated to an increase in GnRH release from the same ME fragments, indicating that these events are coupled. Furthermore, the inhibition of the massive NO/GnRH release on 1600 h Pro by L-NIO, a potent NOS inhibitor, demonstrates that NO secretion and GnRH release are intimately connected and strongly suggests that NO release at the ME is

required to trigger GnRH release during the GnRH preovulatory surge.

Within the last decade, NO has been shown to be a key neurotransmitter involved in the control of GnRH/LH secretion in both males and females. NO release controls basal LH secretion in males (15) and mediates the ovarian steroid-induced LH surge in females (19, 33). Studies carried out *in vivo* (21) suggest that the NO secreted at the hypothalamic preoptic area by nNOS neurons surrounding GnRH cell bodies (18) may be involved in the control of GnRH/LH secretion. On the other hand, our results demonstrate that the NO secreted at the ME plays a crucial role in the control of GnRH release from the neuroendocrine terminals during the female rat estrous cycle. This ME NO secretion may contribute to the synchronization of GnRH release from the anatomically scattered GnRH nerve terminals located in the external zone of the ME, as suggested by *in vitro* studies carried out in cell lines (34). In the immortalized GT1-1 cell line, secreting

GnRH *in vitro* (35) and expressing both nNOS (33, 36) and eNOS (36), the inhibition of these NOS activities by NOS blockers and NO scavengers abolishes the pulsatile GnRH secretion. The authors concluded that NO was the unique neurotransmitter that was necessary to synchronize GnRH neuron activity leading to the establishment of a synchronized pulsatile GnRH secretion (33). However, in the hypothalamus, the GnRH neurons have been shown, thus far, to be devoid of NOS immunoreactivity (18) and, further supporting this observation, they do not exhibit NADPH diaphorase activity (V. Prevot, personal communication) but do secrete their neurohormone in a pulsatile manner into the portal blood capillaries (37, 38). Additionally, NO-donors have been shown, by push-pull perfusion, to directly affect GnRH release (39). Taken together, we surmise that a hypothalamic source of NO, exogenous to GnRH neurons, might control their secretion.

As stated earlier, preoptic area nNOS neurons may play an important role in the control of GnRH cell body activity and thus GnRH/LH secretion; but because they are only closely associated with GnRH neurons in the rostral preoptic area (18), they are unlikely to be the synchronizing link between the scattered GnRH neurons. nNOS neurons may rather relay stimulatory or inhibitory inputs to GnRH neurons, as is the case for β -endorphinergic inputs (40, 41). Intriguingly, mediobasal hypothalamus or ME fragments are able to secrete GnRH in a pulsatile manner (42, 43), demonstrating that the GnRH cell bodies are not necessary for pulsatile GnRH release, suggesting that a mechanism of GnRH pulsatility is located in the mediobasal hypothalamus. Our previous studies demonstrated that NO is produced locally at the ME and that its major source is endothelial in origin (20, 27). At that time, we surmised that this endothelial NO might play a crucial role in the synchronization of GnRH release from the nerve terminals spread across the 2.5-mm-long ME (28). In the present study, the strong inhibition of the potent NO/GnRH release on 1600 h Pro by L-NIO, at a concentration that selectively inhibits endothelial NO release at the ME (20), demonstrates that the spontaneous release of NO from ME fragments that participate in the modulation of GnRH release across the estrous cycle is endothelial in origin. Another finding of interest is that the spontaneous NO release monitored across the estrous cycle seems to be pulsatile in female rats. The mean (\pm SEM) frequency of 1 pulse of NO secretion every 32 ± 1 min ($n = 36$) in females is strikingly similar to the frequency of pulsatile GnRH secretion from explants of sexually-mature male rats (42). Thus, the findings of the present study strongly suggest that the ME endothelial NO is the synchronizing link to anatomically scattered GnRH neurons and that this synchronizing mechanism takes place at the ME, where it regulates GnRH release directly from the neuroendocrine terminals.

Our results also suggest that the increased endothelial ME NO release on Pro may account for the increase of both GnRH basal release and GnRH pulse amplitude (44) on that day of the estrous cycle. Sarkar and Minami (44) showed *in vivo* that, as we observe for ME NO release *ex vivo*, the GnRH basal release and the GnRH pulse amplitude were significantly increased between diestrus and the morning of Pro and that these parameters were maximal the afternoon of

Pro, whereas the GnRH interpulse interval did not change. This interplay between endothelial ME NO and GnRH release in the pituitary portal blood is strengthened by the fact that central administration of eNOS antisense oligonucleotides suppresses the steroid-induced LH surge in OVX rats (19).

Estrogen is known to exert a powerful stimulatory influence on GnRH secretion into the portal blood capillaries from the nerve terminals in the ME, to initiate the LH surge (45). Our results strongly support the fact that estrogen could exert part of its stimulatory effect on the GnRH neuroendocrine system by acting directly on the ME. Indeed, the significant increase in ME NO/GnRH secretion in estrogen-treated OVX rats, compared with OVX untreated females, suggests that the dynamic changes in NO/GnRH release observed on the morning of Pro is coupled to the dramatic increase in estrogen plasma levels that occurs between diestrus II and Pro (46). This is in agreement with the findings that estrogen, in addition to directly stimulating eNOS activity at the ME (20), stimulates both eNOS messenger RNA (mRNA) (47) and protein expression (48) in endothelial cells. Surprisingly, progesterone treatment of estrogen-primed OVX rats did not increase NO release significantly, compared with untreated OVX females, suggesting that progesterone is not the major factor regulating the interrelation between NO secretion and GnRH release. However, we cannot rule out the involvement of the progesterone receptor in increased NO/GnRH secretory activity observed on Pro, because the progesterone receptor is a key component mediating the stimulatory effect of estrogen on GnRH, *i.e.* animals lacking the progesterone receptor fail to show E_2 -induced LH and FSH surges (49), and progesterone receptor antagonists block the robust GnRH/LH surge induced by estrogen in wild-type animals (50, 51).

The mechanism leading to the pulsatile secretion of NO from the ME endothelium remains to be determined. However, there is some information concerning pulsatile endothelial NO release. In this regard, pulsatile pressure occurring in human blood vessels can release eNOS-derived NO (52). Furthermore, endothelial basal NO from blood vessels and other tissues seems to exhibit a basal pulsatile release pattern, even when observed *in vitro* (53). The mechanism of this pulsatile NO secretion from endothelial cells seems to occur via mechanotransduction of the eNOS present in the caveolae of the plasma membrane with caveolin, which is an inhibitory protein for eNOS (54). Dissociation of eNOS from caveolin allows its coupling with calmodulin and thus stimulates its activity. Alternative translocation of eNOS from the cell membrane to intracellular sites, uncoupling the enzyme from its activators, and thereby attenuating the formation and release of NO, could also account for NO pulsatile release. Interestingly, these translocation mechanisms may be modulated by estrogen (55). Therefore, we surmise that, at the ME, other factors (neuronal and/or glial in origin) may also participate in the control of these modulatory mechanisms generating NO pulsatile release. Interestingly, the brain endothelial cells express the receptors for two key factors controlling GnRH release at the ME (17, 32, 56–58), neuropeptide Y (NPY) and glutamate (59–61). Both *N*-methyl *D*-aspartate (NMDA) and NPY have been shown to

activate NO pathway in endothelial cells (62, 63). Reinforcing a potential role for NPY in the regulation of ME, endothelial NO release is the demonstration of the expression of the NPY Y1 receptor within the portal blood vasculature (64), together with the finding that estrogen can up-regulate GnRH response to NPY on Pro, through stimulation of Y1 gene expression (65).

In summary, our data demonstrate that the spontaneous NO release at the ME, which may modulate both pulsatile and cyclic GnRH release, provides a unique regulatory mechanism for the GnRH neuroendocrine axis, by which it could control primary events such as puberty, gametogenesis, and ovulation. In addition, our results both confirm and strengthen a role for the vascular endothelium in the control of neurosecretions at the ME.

References

- McCann SM, Licinio J, Wong ML, Yu WH, Karanth S, Rottori V 1998 The nitric oxide hypothesis of aging. *Exp Gerontol* 33:813-826
- Bredt DS, Snyder SH 1992 Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8:3-11
- Dawson TM, Snyder SH 1994 Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14:5147-5159
- Forstermann U, Cross CE, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H 1994 Nitric oxide synthase isozymes: Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23:1121-1131
- Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F 1991 Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10480-10484
- Forstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F 1991 Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1788-1792
- Choi JJ, Kie QW, Calocay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C 1993 Calmodulin is a cofactor of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 176:599-604
- Steve-Titus R, Marletta MA 1995 Interaction of calmodulin with the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. *Biochemistry* 34:15638-15645
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise ME, Nathan CF 1991 Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7773-7777
- Hevel JH, White RA, Marletta MA 1991 Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase: Identification as a flavin protein. *J Biol Chem* 266:22757-22761
- Jablonska-Shariff A, Olson LM 1998 The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knockout mouse oocytes. *Endocrinology* 139:2944-2954
- Olson LM, Jones-Burton CM, Jablonska-Shariff A 1996 Nitric oxide decreases estradiol synthesis of rat luteinized ovarian cells: possible role for nitric oxide in functional luteal regression. *Endocrinology* 137:3531-3539
- Mami SK, Allen JM, Rottori V, McCann SM, O'Malley BW, Clark JH 1994 Nitric oxide modulates sexual behavior in female rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6468-6472
- Brann DW, Bhat GK, Lamar CA, Mahesh VB 1997 Glucocorticoid transmitters and neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 69:385-393
- Rottori V, Jelova N, Dees WL, Nyberg CL, Gimeno M, McCann SM 1993 Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release *in vivo* and *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10130-10134
- Morello M, Lopez EJ, Negro-Vilar A 1993 Nitric oxide regulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 133:2399-2402
- Boutavera JJ, Sahu A, Kalra PS, Kalra SP 1993 Evidence that nitric oxide may mediate the ovarian steroid-induced luteinizing hormone surge: involvement of constitutive amino acids. *Endocrinology* 133:2481-2487
- Herbison AE, Simonian SX, Norris PJ, Emson PC 1996 Relationship of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity to GnRH neurons in the ovariectomized and intact female rat. *J Neuroendocrinol* 8:73-82
- Aguan K, Mahesh VB, Ping L, Bhat G, Brann DW 1996 Evidence for a physiological role for nitric oxide in the regulation of the LH surge: effect of central administration of antisense oligonucleotides to nitric oxide synthase. *Neuroendocrinology* 64:449-457
- Prevot V, Croix D, Rialas CM, Poulain P, Fruchone GL, Stefano GB, Beauvillain JC 1999 Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat median eminence via a membrane receptor. *Endocrinology* 140:652-659
- Pu S, Xu B, Kalra SP, Kalra PS 1996 Evidence that gonadal steroids modulate nitric oxide efflux in the medial preoptic area: effects of N-methyl D-aspartate and correlation with luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 137:1949-1955
- Rottori V, Gimeno M, Lyson K, McCann SM 1992 Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E2 release from the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11543-11546
- Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL 1985 Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* 313:310-313
- Drouva SV, Epeikaum J, Laplante E, Kordon C 1984 Calmodulin involvement in the Ca²⁺-dependent release of LHRH and SRIF *in vitro*. *Neuroendocrinology* 38:189-192
- Ojeda SR, Negro-Vilar A 1985 Prostaglandin E2-induced luteinizing hormone-releasing hormone release involves mobilization of intracellular Ca²⁺. *Endocrinology* 116:1763-1770
- Ojeda SR, Urbanski HF, Katz KH, Costa ME 1985 Stimulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production enhances hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release without increasing prostaglandin E2 synthesis: studies in prepubertal female rats. *Endocrinology* 117:1175-1178
- Prevot V, Rialas CM, Croix D, Salzet M, Dupouy JP, Poulain P, Beauvillain JC, Stefano GB 1998 Morphine and amandamide coupling to nitric oxide stimulates GnRH and LRF release from rat median eminence: neurovascular regulation. *Brain Res* 790:236-244
- Prevot V, Bouret S, Stefano GB, Beauvillain JC 2000 Median eminence nitric oxide signaling. *Brain Res Brain Res Rev* 34:27-41
- Stefano GB, Christensen VB, Tonnesen E, Liu Y, Hughes TK, Blifinger TV 1996 Interleukin 10 stimulation of endogenous nitric oxide release from human sphenoid veins diminishes immunocytes adherence. *J Cardiovasc Pharmacol* 30:90-95
- Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S 1990 Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol* 101:746-752
- Neil TM, Adams TE 1977 Further studies on the radioimmunoassay of gonadotropin-releasing hormone: effect of radioiodination, antiserum and unextracted serum on levels of immunoreactivity in serum. *Endocrinology* 101:1135-1144
- Moore WM, Webber RK, Jerome GM, Tjoeng FS, Misko TP, Currie MG 1994 L-N6-(1)-nitroethyllysine a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J Med Chem* 37:3886-3888
- Boutavera JJ, Kalra PS, Kalra SP 1996 L-arginine/nitric oxide amplifies the magnitude and duration of the luteinizing hormone surge induced by estrogen: involvement of neuropeptide Y. *Endocrinology* 137:1956-1962
- Lopez EJ, Morello M, Merchenthaler I, Negro-Vilar A 1997 Nitric oxide is involved in the genesis of pulsatile LHRH secretion from immortalized LHRH neurons. *J Neuroendocrinol* 9:647-654
- Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI 1990 Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5:1-10
- Belsham DD, Wetsel WC, Mellon PL 1996 NMDA and nitric oxide act through the cGMP signal transduction pathway to repress hypothalamic gonadotropin-releasing hormone gene expression. *EMBO J* 15:538-547
- Levine JE, Pau KY, Ramirez VD, Jackson GL 1982 Simultaneous measurement of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone release in unanesthetized, ovariectomized sheep. *Endocrinology* 111:1449-1455
- Steiner RA, Bremner WJ, Clifton DK 1982 Regulation of luteinizing hormone pulse frequency and amplitude by testosterone in the adult male rat. *Endocrinology* 111:2055-2061
- Kohsaka A, Watanabe H, Kakizaki Y, Suda T 1999 A comparative study of the effects of nitric oxide and carbon monoxide on the *in vivo* release of gonadotropin-releasing hormone and neuropeptide Y from rat hypothalamus during the estradiol-induced luteinizing hormone surge: estimation by push-pull perfusion. *Neuroendocrinology* 69:245-253
- Pu S, Horvath TL, Diano S, Nafstolin F, Kalra PS, Kalra SP 1997 Evidence showing that beta-endorphin regulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) efflux: anatomical and functional support for an interaction between opiates and nitric oxide. *Endocrinology* 138:1537-1543
- Boutera S, Prevot V, Croix D, Viltart O, Stefano GB, Mitchell V, Beauvillain JC 2000 μ Opioid receptor mRNA expression in neuronal nitric oxide synthase-immunopositive preoptic area neurons. *Mol Brain Res* 80:46-52
- Boutguignon JP, Gerard A, Alvarez Gonzalez ML, Franchimont P 1993 Control of pulsatile secretion of gonadotropin releasing hormone from hypothalamic explants. *Hum Reprod [Suppl]* 21:818-822
- Rasmussen DD 1993 Episodic gonadotropin-releasing hormone release from the rat isolated median eminence *in vitro*. *Neuroendocrinology* 58:511-518
- Sarkar DK, Minami S 1995 Diurnal variation in luteinizing hormone-releasing hormone and beta-endorphin release in pituitary portal plasma during the rat estrous cycle. *Biol Reprod* 53:38-45
- Herbison AE 1998 Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 19:302-330
- Smith MS, Freeman ME, Neill JD 1975 The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin,

- gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96:219-226
42. Welton CP, Hirasawa I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moudada S 1994 Inhibition of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5217-5216
 43. McNeill AM, Kim N, Duckles SP, Krause DN, Koutis HA 1999 Chronic estrogen treatment increases levels of endothelial nitric oxide synthase protein in rat cerebral microvessels. *Stroke* 30:2186-2190
 44. Chappell PE, Schorker JS, Kim P, Xu M, Lydon JP, O'Malley BW, Levine JE 1999 Absence of gonadotropin surges and gonadotropin-releasing hormone self-priming in ovariectomized (OVX), estrogen (E2)-treated, progesterone receptor knockout (PRKO) mice. *Endocrinology* 140:3653-3658
 45. Chappell PE, Lee J, Levine JE 2000 Stimulation of gonadotropin-releasing hormone surges by estrogen. II. Role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 141:1490-1492
 46. Chappell PE, Levine JE 2000 Stimulation of gonadotropin-releasing hormone surges by estrogen. I. Role of hypothalamic progesterone receptors. *Endocrinology* 141:1477-1485
 47. Billfinger TV, Stefano GB 2000 Human aortocoronary grafts and nitric oxide release: relationship to pulsatile pressure. *Ann Thorac Surg* 69:480-485
 48. Stefano GB, Goumon Y, Billfinger TV, Welters I, Cadet P 2000 Basal nitric oxide limits immune, nervous and cardiovascular excitation: human endothelia express a mu opiate receptor. *Prog Neurobiol* 60:531-544
 49. Rizzo V, McIntosh DP, Oh P, Schmitzer JE 1998 *In situ* flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and tubulin association. *J Biol Chem* 273:34724-34729
 50. Goetz RM, Thattai HS, Prabhakar P, Cho MK, Michel T, Golan DE 1999 Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2768-2773
 51. Kalra SP, Crowley WR 1992 Neuropeptide Y: a novel neuroendocrine peptide in the control of pituitary hormone secretion, and its relation to luteinizing hormone. *Front Neuroendocrinol* 13:1-46
 52. Bourguignon JP, Gerard A, Franchimont P 1989 Direct activation of gonadotropin-releasing hormone secretion through different receptors to neuroexcitatory amino acids. *Neuroendocrinology* 49:402-408
 53. Bhat GK, Mahesh VB, Ping L, Chorich L, Wiedmeier VT, Brann DW 1998 Opioid-glutamate-nitric oxide connection in the regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 139:955-960
 54. Abounader R, Elhusseiny A, Cohen Z, Olivier A, Stanimirovic D, Quirion R, Hamel E 1999 Expression of neuropeptide Y receptors mRNA and protein in human brain vessels and cerebrovascular cells in culture. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:155-163
 55. Bso L, Kopp J, Zhang X, Xu ZQ, Zhang LE, Wong H, Walsh J, Hokfelt T 1997 Localization of neuropeptide Y Y1 receptors in cerebral blood vessels. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12661-12666
 56. Kirzbal IA, Deli MA, Pestenecz A, Siklos L, Szabo CA, Andras I, Jon F 1998 Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res* 54:814-819
 57. Nilsson T, Lind H, Brunkvall J, Edvinsson L 2000 Vasodilation in human subcutaneous arteries induced by neuropeptide Y is mediated by neuropeptide Y Y1 receptors and is nitric oxide dependent. *Can J Physiol Pharmacol* 78:251-257
 58. Rossetti ZL, Mameli M, Vargiu R, Fadda E, Mancinelli R 2000 Biphasic effects of NMDA on the motility of the rat portal vein. *Br J Pharmacol* 129:156-162
 59. Li C, Chen P, Smith MS 1999 Morphological evidence for direct interaction between arcuate nucleus neuropeptide Y (NPY) neurons and gonadotropin-releasing hormone neurons and the possible involvement of NPY Y1 receptors. *Endocrinology* 140:5382-5390
 60. Xu M, Urban JH, Hill JW, Levine JE 2000 Regulation of hypothalamic neuropeptide Y Y1 receptor gene expression during the estrous cycle: role of progesterone receptors. *Endocrinology* 141:3319-3327

Description rapide des résultats

Les résultats de cette étude montrent que des fragments d'EM de rates maintenus en survie libèrent spontanément du NO, de façon pulsatile et cyclique, sans ajout de substance. En effet, la sécrétion de NO varie en fonction du stade du cycle œstral : la libération de NO est plus importante le jour du proœstrus (Pro), par opposition au diœstrus II (DII) et à l'œstrus (E). En effet, la sécrétion de NO augmente de 300% entre le DII et le Pro. Le maximum est atteint à 1600h. Cette augmentation est liée essentiellement à un accroissement de l'amplitude des pulses.

De plus, la libération de NO est corrélée positivement à celle de la GnRH : quand la libération de NO augmente, celle de la GnRH augmente également, ce qui laisse supposer une relation étroite entre ces deux molécules.

Concernant l'influence des stéroïdes sur la sécrétion de NO / GnRH, nos résultats tendent à démontrer que les fortes libérations de NO enregistrées dès le matin du Pro seraient dues à une augmentation des taux d'œstradiol circulant. En effet, les rates ovx ont une activité NO / GnRH très faible comparativement à celles qui ont été ovx et traitées en œstradiol.

L'ajout du L-NIO (à une concentration de $5.10^{-7}M$) sur des fragments d'EM de rates à 1600h en Pro a entraîné une baisse significative de l'activité NO / GnRH. Ceci suggère que la majorité du NO mesuré dans l'EM proviendrait de la eNOS, localisée dans les cellules endothéliales des capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire.

Les résultats suggèrent une implication du NO dans la pulsativité et la cyclicité de la libération de la GnRH par l'EM.



II / Etude des variations de la eNOS dans l'EM au cours du cycle œstral et influence des stéroïdes sur l'expression de l'enzyme

Compte tenu des résultats précédents, la poursuite de notre étude a été de chercher les éléments capables ou non de confirmer l'implication de l'endothélium dans la libération de NO et par conséquent dans la libération de la GnRH.

L'enzyme eNOS est une enzyme constitutive dont l'activité est dépendante du complexe Ca^{2+} / CaM (Förstermann *et al.*, 1991 ; Pollock *et al.*, 1991). Nous avons vu précédemment (Introduction, II, *Chapitre 5*) l'existence d'une boucle de régulation entre l'eNOS et la cav-1 (Feron, 1999).

Ainsi, la deuxième partie de ce travail de thèse a été d'étudier les variations d'expression de l'eNOS au cours du cycle œstral dans l'EM, au niveau ARNm par RT-PCR, et au niveau protéique par Western Blot. Avec les mêmes techniques, nous nous sommes intéressés au rôle de l'œstradiol et de la progestérone sur l'expression de l'eNOS dans l'EM, en respectant les conditions expérimentales (ovariectomie, supplémentation) utilisées dans notre première étude.

Enfin, les taux de la protéine inhibitrice cav-1 ont été étudiés dans l'EM de rates cyclées ou en conditions expérimentales (ovx, ovx et supplémentées en stéroïdes).

Ces travaux sont présentés dans le deuxième article paru dans *Endocrinology* (2001, 142(10) : 4288-4294).

Variation of endothelial nitric oxide synthase synthesis in the median eminence during the rat estrous cycle : An additional argument for the implication of vascular blood vessel in the control of GnRH release

Claude Knauf, Stéphanie Ferreira, Malika Hamdane, Christel Mailliot, Vincent Prevot, Jean-Claude Beauvillain, and Dominique Croix

Endocrinology, 2001, 142(10):4288-4294

Variation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Synthesis in the Median Eminence during the Rat Estrous Cycle: An Additional Argument for the Implication of Vascular Blood Vessel in the Control of GnRH Release

CLAUDE KNAUF, STÉPHANIE FERREIRA, MALIKA HAMDANE, CHRISTEL MAILLIOT, VINCENT PREVOT, JEAN-CLAUDE BEAUVILLAIN, AND DOMINIQUE CROIX

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U422, Institut Fédératif de Recherches 23, Unité de Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuronale, 59045 Lille Cedex, France

Recent studies from our laboratory suggested that the vascular endothelium of the median eminence was involved via nitric oxide secretion in the modulation of GnRH release during the estrous cycle. To further investigate that issue, we studied the variations of endothelial nitric oxide synthase protein and mRNA in the median eminence of female rats killed at different time points of the day and/or of the estrous cycle. Endothelial nitric oxide synthase protein levels were measured by Western blot, and endothelial nitric oxide synthase mRNA analysis was performed with semiquantitative RT-PCR (for each time point, $n = 4$). The results revealed that endothelial nitric oxide synthase synthesis varied markedly across the estrous cycle. Indeed, endothelial nitric oxide synthase protein ($n = 20$) and mRNA ($n = 16$) levels increase significantly on 0800 h and 1600 h proestrus compared with 1400 h diestrus II. In a second step, quantification analysis were made in median eminence obtained from ovariectomized and ovariectomized, E2 benzoate primed rat. The results show a significant increase in expression of endothelial nitric oxide synthase protein as well as endothelial nitric oxide

synthase mRNA in ovx-E2 primed rat median eminence. Concurrently, the levels of the cav-1 protein, a specific endogenous inhibitor of endothelial nitric oxide synthase, were measured in median eminence during estrous cycle and in ME from ovx and ovx-E2 primed rats. A significant decrease of median eminence cav-1 was noted on 1600 h proestrus and in ovx-E2 primed rats when compared with 1400 h diestrus II and ovx, respectively. Altogether, these results strongly suggest that high NO release from median eminence observed on proestrus may be due to an increase of endothelial nitric oxide synthase expression and a decrease of the cav-1 protein levels. These findings demonstrate that E2 is able to modulate endothelial nitric oxide synthase and cav-1 expression both during the estrous cycle and in experimental conditions and consequently reinforce the idea that nitric oxide acting on GnRH release, is essentially endothelial in origin. These results may also imply that variations of endothelial nitric oxide synthase expression are essential for the pulsatile/cyclic nitric oxide median eminence release observed in a previous study. (*Endocrinology* 142: 4288-4294, 2001)

NITRIC OXIDE (NO) acts as a brain intercellular messenger (1) and is generated by three isoforms of its synthesizing enzyme, nitric oxide synthase (NOS) (2). The neuronal-type NOS I (nNOS) and the endothelial-type NOS III (eNOS) are constitutive and calcium-calmodulin (Ca^{2+} -CaM) dependent (3, 4), whereas the inducible NOS II (iNOS) may be expressed in many cell types in response to several stimuli including bacterial lipopolysaccharides and inflammatory mediators (5, 6). eNOS is acylated by the saturated fatty acids myristate and palmitate (7, 8). These posttranslational modifications are required for the subcellular targeting of eNOS to the plasmalemma caveolae (9). In endothelial cells, the principal resident coat protein of caveolae, caveolin-1 (cav-1), interacts with eNOS (10) and leads to its inhibition in a reversible process modulated by Ca^{2+} -CaM (11). Recently, eNOS activity appears to be determined primarily by the abundance of cav-1 available for its inhibitory binding to eNOS (12).

Abbreviations: CaM, Calmodulin; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; iv, intracerebroventricular; iNOS, inducible NOS II; ME, median eminence; nNOS, neuronal-type nitric oxide synthase I; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; NSE, neuronal specific enolase.

Among a wide range of physiological and behavioral processes, NO has been implicated in the regulation of prehypophysiotropic secretions at the median eminence (ME) level (13). More precisely, NO may participate in the regulation of the GnRH neurons by stimulating GnRH release from its neuroendocrine terminals (14-18), located in the external zone of the median eminence. In addition, in a recent work, we demonstrated that ME fragments spontaneously release NO (19). This NO generation is likely to be pulsatile and cyclic across the estrous cycle. Moreover, the highest NO concentrations are measured on proestrus and correlated to GnRH release.

At that time, the origin of NO implicated in the GnRH secretion remains to be clearly determined. While nNOS has been detected in cell processes in the internal zone generally far away from GnRH nerve endings, eNOS immunoreactivity was restricted to the vascular tissue (20), very close to the neuroendocrine nerve terminals. Thus, endothelium might be the major source of NO implicated in the GnRH release in the ME, although some authors consider that NO has rather a neuronal origin (14, 21). The endothelial hypothesis is consistent with the facts that 1) rat ME fragments stimu-

lated with exogenous substances, such as E2 or morphine, are able to release NO from vascular endothelium (17, 18); 2) addition of L-NIO, a preferential eNOS inhibitor when used at certain concentrations, induces a decrease in the spontaneous NO/GnRH release from rat ME (18, 19); and 3) intracerebroventricular (icv) injection of eNOS antisense is more efficacious than nNOS antisense in inhibiting the E2/progesterone-induced GnRH/LH surge in ovariectomized female rats (22).

The fact that NO might originate from endothelium is relevant because it points out an important role of endothelial cells in neuroendocrine regulations that constitute a new concept that we have advanced in our last results (17–19). However, further data are needed to definitely consider this concept as accepted. In this perspective, the aim of this work is essentially to evaluate the variations of eNOS expression in the ME during estrous cycle using RT-PCR and Western Blot experiments. As concentrations of circulating gonadal steroids are known to vary across the estrous cycle, the part played by E2 and progesterone in controlling eNOS expression was also investigated in the ME of steroids-treated ovariectomized (ovx) female rat. In regard to the possible specific inhibitory action of cav-1 on eNOS activity, we also focus our attention on the possible existence of cav-1 protein in the ME. As a consequence, levels of the inhibitory cav-1 protein were studied in the ME of cycling or steroids-treated ovx female rats. This work supplies evidence that eNOS expression in the ME is steroid dependent and higher the day of proestrus, reinforcing the idea that NO of endothelial origin has an important role on GnRH release. Moreover, the inhibitory cav-1 protein seems to be an important modulator of eNOS activity in the ME. These results give additional proof for an essential role of vascular endothelium in controlling NO/GnRH release.

Materials and Methods

Animals

Female Wistar rats (CERJ, St Berthevin, France), weighing 250–300 g, were housed in cages on a 0500 h–1900 h light/dark cycle and temperature (23–25°C)-controlled room with free access to food and water. All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC).

Female cycling rats

Vaginal lavage of female rats was examined daily, and only rats that exhibited at least two consecutive 4-d estrous cycles were used for the present experiments. Female rats were killed by decapitation at 1400 h on diestrus II (DII), at 0500 h, 1600 h, 1800 h on proestrus (Pro), and at 0500 h on estrus (E). After rapid removal of the brain, the ME and associated vascular tissues were dissected under a binocular magnifying glass by cutting with Wecker's scissors (Marta, France) the floor of the brain within the following limits: posterior border of the optic chiasma and the anterior border of the mammillary bodies, as described before (23). Following this dissection procedure, pieces containing ME were obtained with very little arcuate nucleus fragments. The total dissection time was less than 3 min from decapitation. For each stage of the estrous cycle, 9 animals were killed to obtain sufficient quantities of total RNA (4 animals) for RT-PCR and proteins (5 animals) for Western blotting.

Ovariectomized rats

Twenty-seven animals were bilaterally ovariectomized (ovx) under ether anesthesia. The animals were divided in three groups: 9 animals

were killed at 1400 h on d 17 without receiving any treatment; 9 animals received a single sc injection of E2 (30 µg/rat) at 1000 h on day 1; 4 animals were killed at 1400 h on day 17; and 9 animals received sc 30 µg of E2 at 1000 h on day 15 and 2 mg of progesterone (P) at 1000 h on day 17 and were killed the same day at 1400 h. In these experimental conditions, E2 + P treatment to ovx rats induces the LH surge at 1400 h (16).

After dissection, the ME fragments were stocked at –80°C.

RT-PCR of eNOS and 28S

Total RNA from ME (4 ME) was extracted using RNeasy kit (QIAGEN, Les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions. A quantity of 0.5 µg of the total RNA was reverse transcribed using the Superscript One Step RT-PCR system (Life Technologies, Inc., Cergy Pontoise, France). eNOS-specific primers were similar to those used by Keilhoff et al. (24). The sequence of the primers used for PCR were sense 5'-GAG AAT TCC ACC TCA CTG TAG CTG TAG CTG TGC TGG CA-3' and antisense 5'-TCG AAT TCC CAG GGC ACT GCG CCC CGC AAC TG-3', and allowed the amplification of a 740-bp product. As internal control, the 28S rDNA was amplified with the specific primers (sense: 5'-GCA GGG CGA AGC AGA AGG AAA CT-3'; antisense: 5'-TGA GAT CGT TTC GGC CCC AA-3'), which should amplify a 229 bp product. RT was performed at 55°C for 30 min in a Biometra T Gradient cycler and followed by 30 cycles (eNOS) or 14 cycles (28S) consisting of denaturation at 94°C for 1 min, annealing for 1 min at 63°C (eNOS) or 60.9°C (28S), and DNA extension at 72°C for 2 min 30. Under these experimental conditions, the linearity of the amplification was observed up to 40 cycles for eNOS and 16 cycles for 28S. PCR products were subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel containing ethidium bromide. The estimation of the band size was performed using the 100-bp DNA ladder marker (Life Technologies, Inc.). The identity of the amplified eNOS product was confirmed by restriction enzyme digestion with *AclI*, *AraI*, and *EcoRI*.

Detection of eNOS and cav-1 proteins by immunoblotting

Tissues fragments (5 ME) of the same stages were recovered in ice cold lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 1% NP-40, 1% Triton, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) with protease inhibitors (complete, mini, Roche Molecular Biochemicals, Neuilly, France), sonicated and rocked overnight at 4°C. The total cell lysate is recovered in supernatant after centrifugation at 12,000 × g at 4°C for 20 min. Protein concentration was determined using the Protein Assay Reagent BCA kit (Pierce Chemical Co., Madison, WI).

Equal amounts of the solubilized proteins from ME were separated in SDS-polyacrylamide gel (ratio acrylamide/bis acrylamide 37.5/2) and electrotransferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked for 30 min in TNT buffer (Tris-buffered saline, pH 8, with 0.05% Tween) containing 5% milk. Then, membranes were incubated for 1 h 30 at room temperature with polyclonal antibody against eNOS (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA; dilution: 1/500), cav-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., dilution: 1/1000) and neuronal specific enolase (NSE, Tebu, dilution: 1/50000) as internal control. Antibodies for eNOS, cav-1, and NSE were added successively on to the same membrane. After washing three times with TNT buffer, membranes were incubated with horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG antibody (Sigma, Saint Quentin, France). Immunoreactivity was detected using an enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France).

Results analysis

Concerning RT-PCR studies, bands intensity was determined by the use of the Kodak Digital Science program. Blots quantification was performed by Image Master 1D program (Amersham Pharmacia Biotech).

All experiments were repeated at least of 4 times.

Statistical analysis

All data are presented as the mean ± SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA. A Dunnett test was performed to compare the data shown on figures. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Variation of eNOS levels in the rat ME throughout the estrous cycle

Western blot analysis of eNOS. The eNOS protein levels were analyzed in the ME across the estrous cycle by Western blot. A single band of 140 kDa corresponding to eNOS protein was detected (Fig. 1A). NSE served as internal control (Fig. 1B). eNOS protein levels during the estrous cycle were determined by normalization of eNOS densitometric values to NSE ones (Fig. 1C). eNOS protein levels significantly increased on 0800 h and 1600 h proestrus, compared with 1400 h diestrus II, then returned to basal value on 1800 h proestrus and 0800 h estrus ($P < 0.05$).

Semiquantification of eNOS mRNA. To determine whether the variation of eNOS protein occurs at synthesis level, we performed RT-PCR analysis. Amplification of a 730-bp fragment was obtained from total mRNA of ME, corresponding to the expected size. Enzymatic digestion of this fragment by three different restriction enzymes confirmed the specificity of the PCR products (data not shown). The amount of eNOS mRNA has been analyzed during estrous cycle. 28S served as internal control (Fig. 2A). Densitometric values of eNOS were normalized with respect to those of 28S (Fig. 2B). Our results demonstrate a significant increase in mRNA eNOS levels on proestrus 0800 h and 1600 h compared with diestrus II 1400 h ($P < 0.05$). No significant variation was observed on

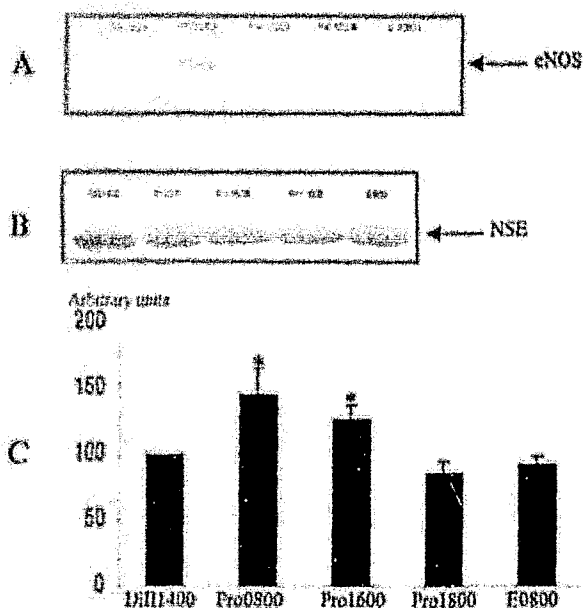


Fig. 1. Western blot analysis of eNOS protein level in rat ME during the estrous cycle. A and B, Representative results of eNOS (140 kDa) and NSE (42 kDa), respectively. NSE was used as internal control. C, Histogram representation of eNOS protein levels. Protein levels were normalized with respect to total NSE to control for internal variations, $n = 20$ animals per group. DIII 1400 h was brought back to an arbitrary value corresponding to 100. DIII 1400 h was chosen as control group (basal value = 100 arbitrary units). *, Significantly different from DIII1400 ($P < 0.05$). Data are expressed as arbitrary units.

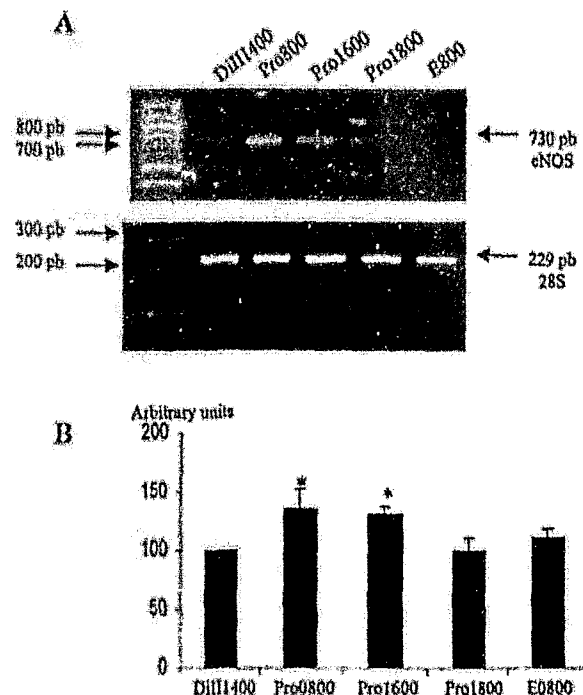


Fig. 2. eNOS mRNA levels at the ME level during the estrous cycle. A, RT-PCR experiments. RNA was extracted from rat ME at DIII1400, Pro0800, Pro1600, Pro1800, and E0800. eNOS cDNA was amplified as a band of 730 bp and the internal control 28S as 229 bp. Left lane, DNA 100 bp ladder. B, Histogram representation of eNOS mRNA variations. Levels of mRNA were expressed as a ratio of densitometric values of eNOS to 28S, $n = 16$ animals per group. DIII1400 ratio was brought back to an arbitrary value corresponding to 100. DIII1400 was chosen as vs. control group (basal value = 100). *, Significantly different from DIII1400 ($P < 0.05$). Data are expressed as arbitrary units.

proestrus 1800 h and estrus 0800 h. These results suggested that eNOS mRNA level is transiently augmented on proestrus day.

Effect of ovarian steroids on eNOS expression

To assess whether E2 was involved in the regulation of eNOS levels during estrous cycle and to determine the putative role of progesterone, comparison of eNOS expression was performed in the ME of ovariectomized rats (ovx), ovx rats supplemented with E2 (ovx + E2), and ovx + E2 rats supplemented with progesterone (ovx + E2 + P).

Variations of eNOS protein levels in the rat ME in experimental conditions. We analyzed eNOS protein levels in the ME from these animals by Western blot (Fig. 3A). NSE was also analyzed as internal control (Fig. 3B), and eNOS level has been normalized with respect to NSE (Fig. 3C). The eNOS protein levels significantly increased in the ovx + E2 rat ME and in ovx + E2 + P rat ME ($P < 0.05$).

Semiquantification of eNOS mRNA at the rat ME level in experimental conditions. As previously described, we detected a unique band of 730 bp corresponding to eNOS cDNA which was normalized to 28S (Fig. 4A). As shown in Fig. 4B, treat-

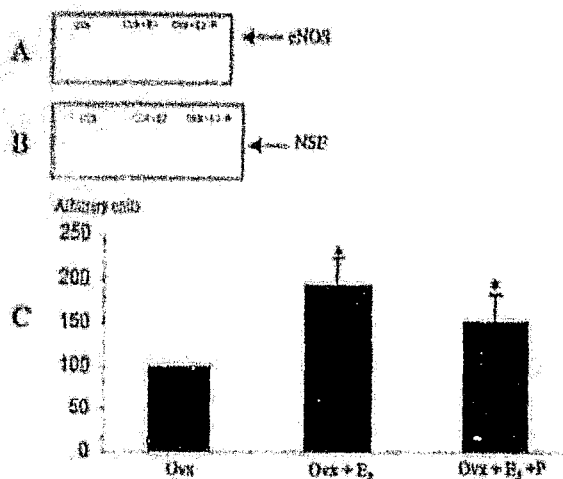


FIG. 3. Western blot analysis of eNOS protein levels in ovx rat ME (Ovx) or ovx rat ME treated with E₂ (Ovx + E₂) alone or with E₂ plus progesterone (Ovx + E₂ + P). A and B, Representative results of eNOS and NSE, respectively. NSE was used as internal control. C, Histogram representation of eNOS protein levels. Levels of protein were expressed as percent NSE to control for internal variations; n = 20 animals per group. Ovx ratio was brought back to an arbitrary value corresponding to 100. Ovx was chosen as *vs.* control group (basal value = 100 arbitrary units). *, Significantly different from Ovx ($P < 0.05$). Data are expressed as arbitrary units.

ment with E₂ of ovx rats caused a very important elevation eNOS mRNA in the ME ($P < 0.05$). The additional supplementation with P led to a decrease of eNOS mRNA concentrations to nadir levels, i.e. similar to the one observed in ovx animals (Fig. 4B). These results suggested that E₂ exerts a stimulatory effect on eNOS transcript that seems to be blocked by progesterone.

Variation of cav-1 protein levels

It is well known that the diminution of cav-1 expression is associated with an increase in eNOS activation (12). Thus, cav-1 protein variations were analyzed at the ME level by Western blot. This analysis was performed during the estrous cycle. The cav-1 protein levels decreased on proestrus 1600 h (Fig. 5A). High levels of cav-1 protein were detected on diestrus II 1400 h and proestrus 0800 h. Levels of cav-1 on proestrus 1800 h and estrus 0800 h were intermediary (Fig. 5B). Western blot analysis of cav-1 in ME show that E₂ and E₂ + P treatments in ovx animals result in a decrease of cav-1 protein levels (Fig. 6). Consequently, steroids may have an opposite regulatory role on eNOS and cav-1.

Discussion

In this study, using RT-PCR and Western blotting experiments, we demonstrated that eNOS expression from female ME varied markedly across the estrous cycle. Thus, eNOS mRNA expression, which is low during diestrus II, increased about 40% on 0800 h and 30% on 1600 h proestrus, then returned to basal value on proestrus 1800 h and estrus 0800 h. Both protein and mRNA levels followed similar variations. As a consequence, eNOS protein expression is highest on 0800 h and 1600 h proestrus than on 1400 h diestrus II.

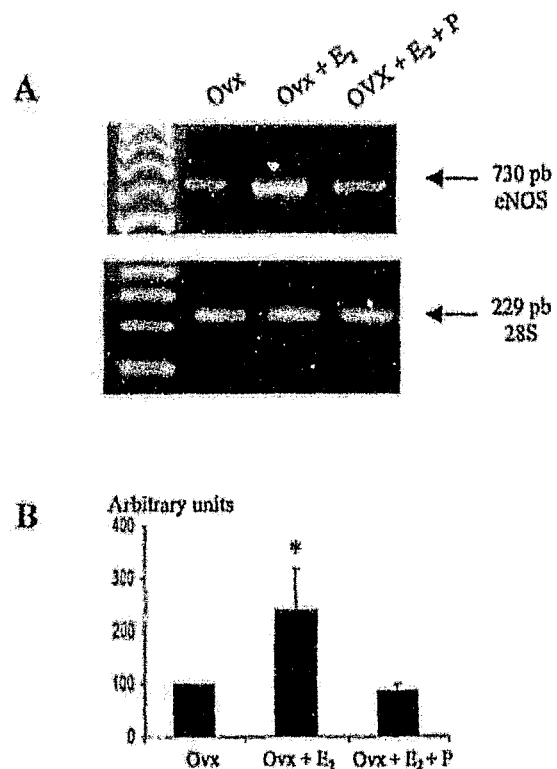


FIG. 4. Influence of steroids on the eNOS mRNA levels at the ME level. A, RT-PCR experiments. RNA was extracted from ME of ovx, ovx + E₂ and ovx + E₂ + P rats. eNOS cDNA was amplified as a band of 730 bp. 28S served as internal control. Left lane, DNA 100-bp ladder. B, Histogram representation of eNOS mRNA variations; ovx, ovx + E₂, ovx + E₂ + P. Levels of mRNA were expressed as a ratio of eNOS densitometric value to 28S; n = 16 animals per group. Ovx ratio was brought back to an arbitrary value corresponding to 100. Ovx was chosen as *vs.* control group (basal value = 100). *, Significantly different from ovx ($P < 0.05$). Data are expressed as arbitrary units.

The part played by NO in controlling GnRH release into the fenestrated pituitary portal blood vessels of the median eminence is now evident. Inhibition of the NO pathway by icv administration of NOS inhibitors or antisense provokes a lack of the GnRH/LH secretory activity (14, 22). At the ME level, eNOS immunoreactivity was observed at the external zone, very close to the GnRH terminals, as opposed to nNOS immunoreactive cells located in the internal zone of the ME (20, 25). In this regard, a new idea has emerged suggesting that NO might rather have an endothelial origin and has led to the concept that vascular endothelium might have a role in neuroendocrine controls (25). Indeed, although several authors have demonstrated the importance of nNOS in controlling GnRH cell bodies activity at the preoptic area and in the ME (14, 21, 26), the majority of NO measured at the ME level might be endothelial in origin. Using amperometric probes, Prevot *et al.* (17, 18) show that rat ME fragments, stimulated with exogenous substances, release NO and give arguments for an endothelial origin. The same authors demonstrate that this NO stimulates GnRH release. The endothelial origin of NO secreted from ME fragments is also

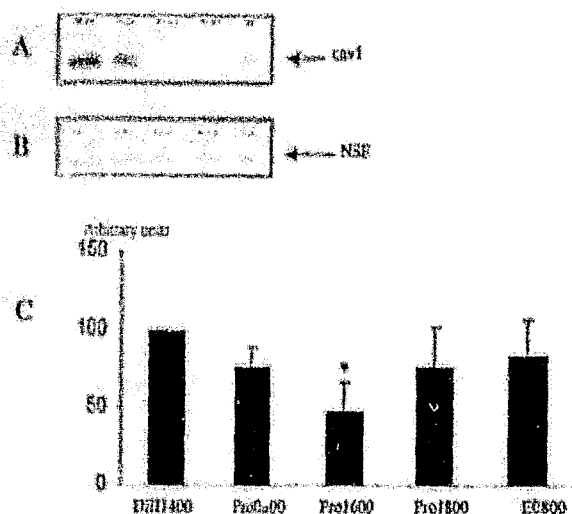


Fig. 5. Western blot analysis of cav-1 protein level in rat ME during the estrous cycle. **A**, Representative results of cav-1 (22 kDa). **B**, NSE was used as internal control. **C**, Histogram representation of cav-1 protein levels. Levels of protein were expressed as percent NSE to control for internal variations; $n = 20$ animals per group. DiE1400 h was brought back to an arbitrary value corresponding to 100. DiE1400 h was chosen as *in vivo* control group (basal value = 100 arbitrary units). *, Significantly different from DiE1400 ($P < 0.05$). Data are expressed as arbitrary units.

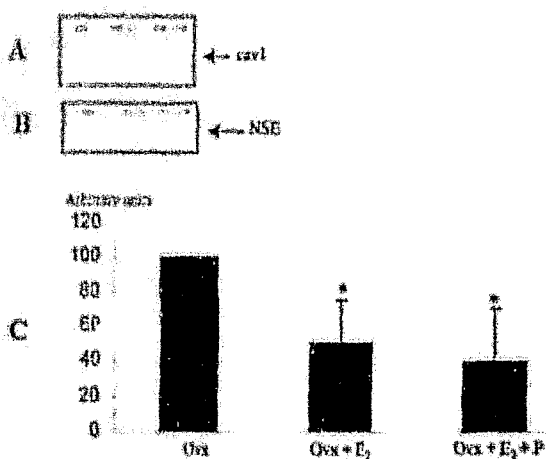


Fig. 6. Western blot analysis of cav-1 protein levels in ovx rat ME (Ovx) or ovx rat ME treated with E₂ (Ovx + E₂) alone or with E₂ plus progesterone (Ovx + E₂ + P). **A**, Representative results of cav-1. **B**, NSE was used as internal control. **C**, Histogram representation of cav-1 protein levels. Levels of protein were expressed as percent NSE to control for internal variations; $n = 20$ animals per group. Ovx ratio was brought back to an arbitrary corresponding to 100. Ovx was chosen as *in vivo* control group (basal value = 100 arbitrary units). *, Significantly different from Ovx ($P < 0.05$). Data are expressed as arbitrary units.

consistent with the work of Aguan *et al.* (22), showing that *in vivo* administration of eNOS antisense is more efficacious than nNOS antisense in suppressing the E₂/progesterone-induced GnRH/LH surge in ovx female rats. The role of eNOS in reproductive functions is reinforced by the obser-

vation that eNOS KO female mice present dysfunction in cyclicality, ovulation rate, ovarian morphology, and steroidogenesis (27). Nevertheless, in spite of the disorder, eNOS KO female mice are still fertile suggesting that the loss of the function of the protein derived from the disrupted gene is compensated by other mechanisms.

Recently, we provided compelling evidence demonstrating the importance of NO in controlling GnRH release during the estrous cycle (19). Indeed, spontaneous NO release from ME fragments from cycling female appeared to be pulsatile and cyclic, in parallel to GnRH release. NO significantly increased from 0800 h proestrus to 1600 h proestrus. In this previous study, the NO pulsatility recorded at the ME level was significantly inhibited by L-NIO at 5×10^{-7} M, a preferential eNOS inhibitor at this concentration (28). In the present data, by evaluating the level of eNOS expression in rat ME across the estrous cycle, we show that the increase of NO release on proestrus is concomitant to an increase in eNOS synthesis. This observation reinforces the idea that endothelium is implicated in the GnRH release during the estrous cycle.

The following point to answer now is: what is able to stimulate eNOS during the estrous cycle? Activity and expression of eNOS are regulated by various molecules (29), including E₂. The fact that eNOS variations are observed during the estrous cycle naturally suggests that steroids are implicated in this phenomenon. In addition, a previous work from our laboratory has also reported that E₂ was able to induce very rapidly a secretion of NO, suggesting the implication of a membrane receptor for E₂ (18). Besides this rapid effect, it has also been demonstrated the existence of long-term effect of E₂ on eNOS mRNA (30) and protein synthesis in endothelial cells (31). Altogether, these results strongly lead to think that the increase in eNOS levels are linked to steroid variations. More precisely, it seems that E₂ is the main gonadal steroid responsible for this increase: 1) treatment of ovx with E₂ increases NO secretion (18, 19) and stimulates eNOS expression in the present work while; and 2) the subsequent treatment with P of ovx + E₂ animals decreases NO secretion (19) and suppresses the stimulatory effect of E₂ on eNOS mRNA expression. However, it can be noted that, in these experimental conditions, levels of eNOS protein remain high after P supplementation, suggesting that P has an inhibitory effect on eNOS mRNA expression but not on eNOS mRNA translation. Conversely in physiological conditions, *i.e.* during the estrous cycle, both eNOS protein and eNOS mRNA levels drop between proestrus 1600 h and proestrus 1800 h and remain low on estrus. At the moment, little is known about P influences on NOS transcription. It had been demonstrated that treatment with P caused a time- and dose-dependant inhibition of NO production by macrophage cell lines (RAW 264.7, J774) by reduction of iNOS mRNA (32, 33). We surmise that after the E₂-stimulatory effect on eNOS, P may inhibit eNOS gene expression, to come back to basal value of eNOS mRNA observed from 1800 h proestrus to diestrus II. Important eNOS protein concentration observed in Ovx + E₂ + P animals are probably due to a high previous synthesis of the enzyme, in response to E₂ in this experimental condition.

As stated earlier, eNOS is regulated by a transmembrane

protein, *cav-1*. Indeed, in vascular endothelial cells, eNOS is targeted to plasmalemmal caveolae (34), where it interacts with *cav-1*. The interaction of eNOS with *cav-1* occurs by direct protein-protein interaction that involves 20 amino acids region within the *cav* sequence (35, 36), termed the "caveolin scaffolding domain" (37). Coupled to *cav-1*, eNOS enzyme is tonically inhibited. The dissociation of *cav-1* from eNOS directly activates the enzyme, which translocates to intracellular sites (34). In the present study, the increase in eNOS protein expression and the decrease of *cav-1* protein expression at the ME level on the afternoon of proestrus demonstrate that the high eNOS activity recorded was due to an inverse mode of regulation of two interactive molecules. The combination of increased eNOS and decreased *cav-1* expression under the influence of E2 has been previously observed in pial arteriolar by Pelligrino *et al.* (38). It has been shown that E2 stimulates eNOS expression and activity, through down-regulation of *cav-1*. However, the ability of E2 to modify eNOS activity/expression via controlling *cav-1* expression is only one possibility to explain the variations of eNOS activity on proestrus. Indeed, in addition to myristoylation and palmitoylation that permitted the interactions with *cav-1*, eNOS can be modified by phosphorylation (39). The phosphorylation of eNOS is thought to regulate enzyme activity in a calcium-independent fashion (40, 41), but the signaling pathway implicated is not yet known. For example, several authors have focused their attention on the Akt kinase pathway, which can directly phosphorylate eNOS and activate the enzyme (42, 43). This way may be further explored in our amperometric model, which did not take into account the rapid and calcium-independent mechanism involved in eNOS activation.

In summary, our results demonstrate that eNOS/*cav-1* levels are modified during the estrous cycle in an inverse profile, probably in response to variable plasmatic concentrations of E2. The high levels of NO that are observed concomitantly to the GnRH surge on the afternoon of proestrus seem consequently to be the results of an increase in eNOS synthesis coupling with a decrease in the concentration of the inhibitory protein *cav-1*.

Acknowledgments

The authors thank Drs. Marie-Laure Caillet-Boudin and Luc Buée for helpful discussion.

Received April 16, 2001; Accepted June 28, 2001.

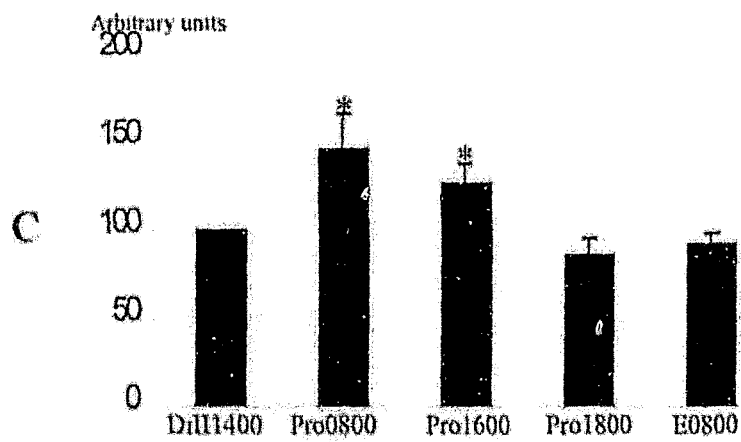
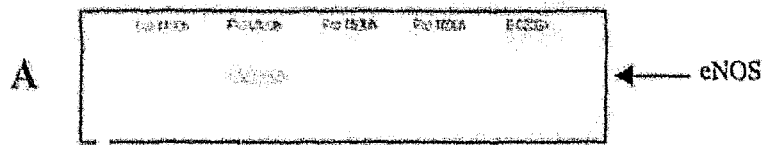
Address all correspondence and requests for reprints to: Claude Knauf, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U422, Institut Fédéral de Recherches 23, Unité de Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuroendocrine, 59045 Lille Cedex France. E-mail: knauf@lille.inserm.fr

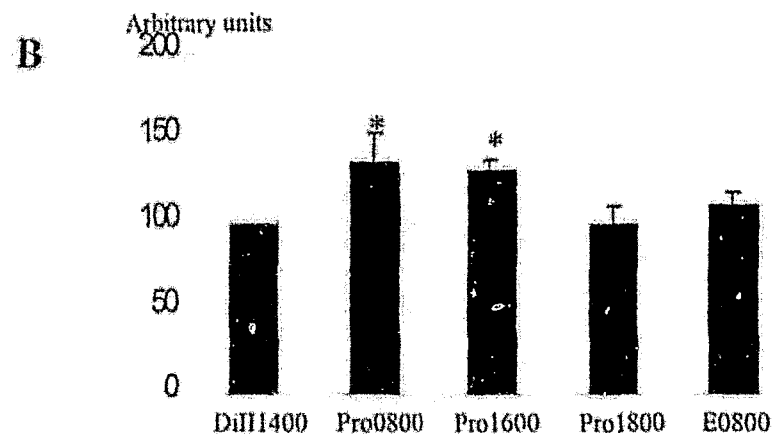
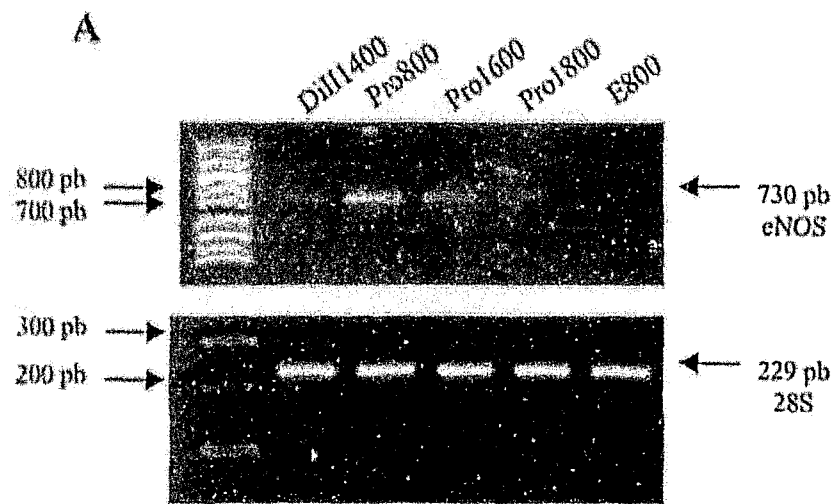
This work was supported by the University of Lille II, the Fonds Européens de Développement en Région (FEDER) (Lille-Amiens Rouen-Covent network), the Centre Hospitalier Régional et Universitaire of Lille, and the Région Nord-Pas-Calais.

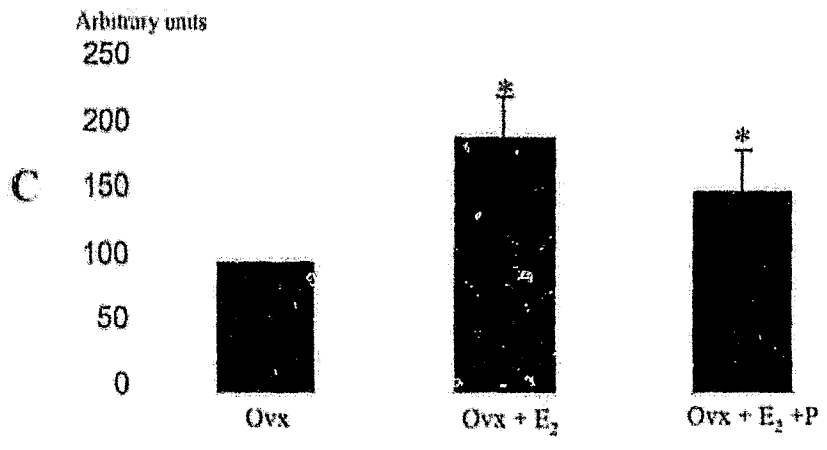
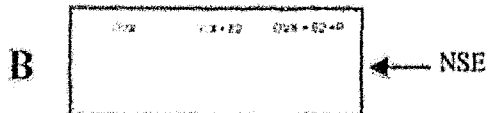
References

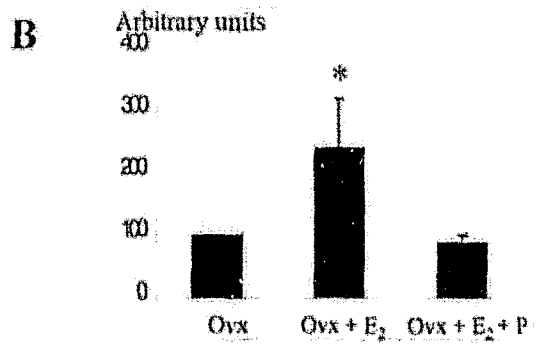
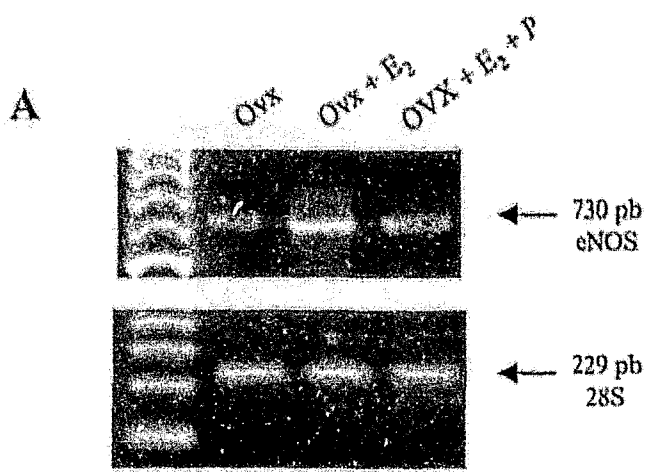
- Dawson TM, Snyder SH 1994 Gas as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14:5147–5159
- Forstermann U, Ciessa EJ, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H 1994 Nitric oxide synthase isoforms: Characterization, purification, molecular cloning, and function. *Hypertension* 23:1121–1133
- Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F 1991 Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10480–10484
- Forstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F 1991 Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1768–1792
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MP, Nathan CF 1991 Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7773–7777
- Hevel JH, White KA, Marletta MA 1991 Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* 266:22789–22791
- Busconi L, Michel T 1993 Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem* 268:8410–8413
- Robinson LJ, Busconi L, Michel T 1995 Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 270:995–998
- Pactwa RG 1996 Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol* 8:542–548
- Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T 1996 Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 271:22810–22814
- Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T 1997 Reciprocal regulation of endothelial nitric oxide synthase by Ca^{2+} -calmodulin and caveolin. *J Biol Chem* 272:15583–15586
- Feron O, Dessy C, Desager JP, Balligand JL 2001 Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation* 103:113–118
- Brann DW, Bhat GK, Lamar CA, Mahesh VB 1997 Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 63:385–395
- Keltai V, Belzari N, Dees WL, Nyberg CL, Gimeno M, McCann SM 1993 Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10130–10134
- Moretto M, Lopez FJ, Negro-Vilar A 1993 Nitric oxide regulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 133:2399–2402
- Bonavera JJ, Sahu A, Kalra PS, Kalra SP 1993 Evidence that nitric oxide may mediate the ovarian steroid-induced luteinizing hormone surge: involvement of excitatory amino acids. *Endocrinology* 133:2431–2437
- Prevat V, Rialas CM, Croix D, et al. 1998 Morphine and anandamide coupling to nitric oxide stimulates GnRH and CRF release from rat median eminence: neurovascular regulation. *Brain Res* 790:236–244
- Prevat V, Croix D, Rialas CM, Poulain P, Frécheville GL, Stefano GB, Beauvillain JC 1999 Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat median eminence via a membrane receptor. *Endocrinology* 140:652–659
- Knauf C, Prevat V, Stefano GB, Mortreux G, Beauvillain JC, Croix D 2001 Evidence for a spontaneous nitric oxide release from the rat median eminence: Influence on gonadotropin-releasing hormone release. *Endocrinology* 142:2343–2350
- Yamada K, Emson P, Hokfelt T 1996 Immunohistochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat hypothalamus and colocalization with neuropeptides. *J Chem Neuroanat* 10:297–316
- Herblison AE, Simonian SX, Norris PJ, Emson PC 1996 Relationship of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity to GnRH neurons in the ovariectomized and intact female rat. *J Neuroendocrinol* 8:73–82
- Aguan K, Mahesh VB, Ping L, Bhat G, Brann DW 1996 Evidence for a physiological role for nitric oxide in the regulation of the LH surge: effect of central administration of antisense oligonucleotides to nitric oxide synthase. *Neuroendocrinology* 64:449–455
- Pu S, Xu B, Kalra SP, Kalra PS 1996 Evidence that gonadal steroids modulate nitric oxide efflux in the medial preoptic area: effects of *N*-methyl-D-aspartate and correlation with luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 137:1949–1955
- Keilhoff G, Seidel B, Noack H, Tischmeyer W, Stanek D, Wolf G 1996 Patterns of nitric oxide synthase at the messenger RNA and protein levels during early rat brain development. *Neuroscience* 75:1193–1201
- Prevat V, Bourret S, Stefano GB, Beauvillain JC 2000 Median eminence nitric oxide signaling. *Brain Res Rev* 34:27–41
- Lamar CA, Bhat GK, Mahesh VB, Brann DW 1999 Evidence that neuronal nitric oxide synthase but not heme oxygenase increases in the hypothalamus on proestrus afternoon. *Neuroendocrinology* 70:360–367
- Jablonska-Shariff A, Olson LM 1998 The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology* 139:2944–2954
- Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HE, Moncada S 1990 Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101:746–752
- Feron O 1999 Endothelial nitric oxide synthase expression and its functionality. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2:291–296
- Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S 1994 Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5212–5216

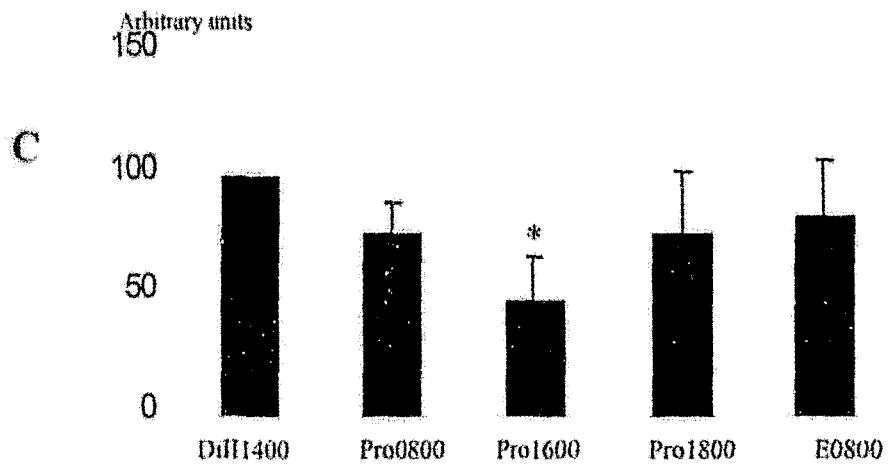
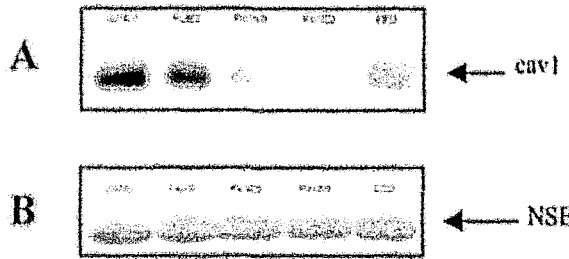
31. McNeill AM, Kim N, Duckles SP, Krause DN, Kontos HA 1999 Chronic estrogen treatment increases levels of endothelial nitric oxide synthase protein in rat cerebral microvessels. *Stroke* 30:2185-2190
32. Salaman AL, Linn SC, Strahs C 2000 Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase mRNA expression in human intestinal epithelial cells. *Int J Mol Med* 6:207-216
33. Miller F, Alley TW, Murphy WJ, Russell SW, Hunt JS 1996 Progesterone affects inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in murine macrophages. *J Leukoc Biol* 59:442-450
34. Michel T 1999 Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Braz J Med Biol Res* 32:1367-1368
35. Michel JB, Feron O, Sarr K, Prabhakar P, Michel T 1997 Caveolin versus caldesmon: constitutively allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 272:25907-25912
36. Jo H, Zou R, Venema VJ, Venema RC 1997 Direct interaction of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 272:18522-18525
37. Li S, Couet J, Lisanti MP 1996 Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 271:29182-29190
38. Pelligrino DA, Ye S, Tan F, Santizo RA, Feinstein DL, Wang Q 2000 Nitric oxide-dependent pial arteriolar dilation in the female rat: effects of chronic estrogen depletion and repletion. *Biochem Biophys Res Commun* 269:165-171
39. Robinson TJ, Ghanoui P, Michel T 1996 Posttranslational modifications of endothelial nitric oxide synthase. *Methods Enzymol* 268:436-448
40. Coejon MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG 1996 Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 79:984-991
41. Fleming I, Busse R 1999 Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* 43:532-541
42. Falton D, Gratton JP, ArcCabe TJ, et al 1999 Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399:597-601
43. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler D, Hermann C, Busse R, Zeiher AM 1999 Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399:601-605

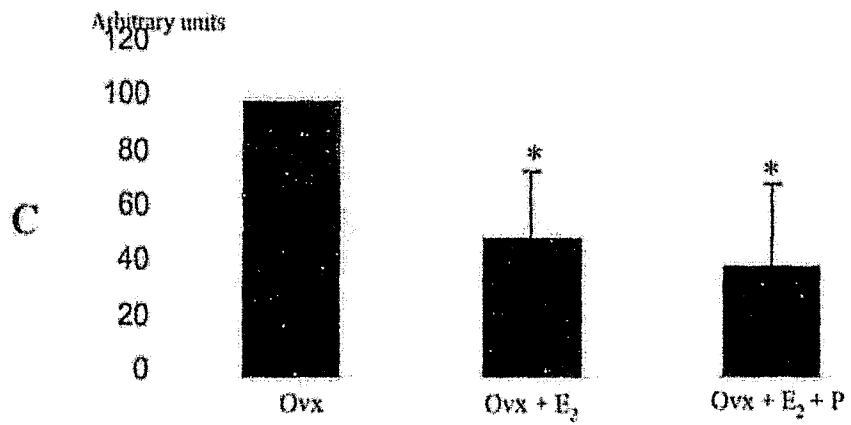
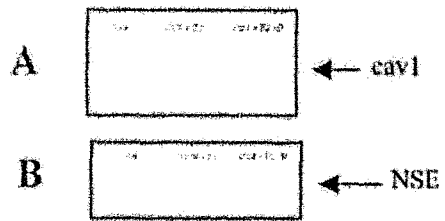












Description rapide des résultats

Ce travail montre que les taux d'ARNm et de protéines eNOS augmentent significativement en Pro 0800h et en Pro1600h par opposition au Dill 1400h. Ces taux retournent à l'état basal dès 1800h en Pro.

La supplémentation en œstradiol seul ou en œstradiol et progestérone chez des rates ovx entraîne une augmentation du taux de protéines eNOS dans l'EM par opposition aux rates ovx. L'œstradiol provoque une augmentation significative du taux d'ARNm eNOS dans l'EM. La progestérone semblerait inhibitrice sur la transcription du gène de l'eNOS, mais ce résultat reste à vérifier.

L'expression de la protéine cav-1 présente un profil inverse de celui de l'eNOS : les taux de protéines cav-1 sont très significativement diminués à 1600h en Pro. Les animaux ovx présentent des taux élevés de cav-1 par opposition aux animaux ovx supplémentés en œstradiol seul ou en œstradiol plus progestérone. Les stéroïdes, et notamment l'œstradiol, ont donc un effet inverse sur l'expression de la cav-1.

L'ensemble de ces résultats suggère que les fortes libérations de NO mesurées l'après-midi du Pro pourraient être dues à une augmentation de l'expression de l'eNOS, mais également à une diminution du taux de la protéine inhibitrice cav-1. De plus, cette régulation inverse de l'expression de ces deux protéines ferait intervenir l'œstradiol.

Ces résultats démontrent définitivement l'implication de la eNOS dans la libération de la GnRH. Ce travail apporte par ailleurs un nouveau concept en neuroendocrinologie selon lequel l'endothélium, via le NO synthétisé par l'eNOS pourrait avoir un rôle crucial dans le contrôle de la pulsativité des neurosécrétions au niveau de l'EM.

III / Implications des neuropeptides de l'éminence médiane dans la sécrétion spontanée de NO

La libération spontanée de NO par l'EM peut être liée à un fonctionnement endogène des cellules endothéliales des capillaires du plexus porte. Cependant, elle pourrait être liée à la pulsativité d'autres systèmes peptidergiques se terminant dans la zone externe de l'EM, susceptibles d'agir sur les cellules endothéliales. Parmi les nombreux neuropeptides, nous nous sommes focalisés sur deux d'entre eux ayant des sites de liaisons dans l'EM : le NPY et la galanine.

1) Rôle du NPY

Le NPY est connu pour stimuler la libération de GnRH *in vivo* (Besecke et Levine, 1994) et *in vitro* (Besecke *et al.*, 1994). *In vivo*, l'implication du récepteur Y1 a clairement été établie chez le rat (Kalra *et al.*, 1992), mais aucune étude n'a démontré un rôle du récepteur Y2. Cependant, la stimulation des récepteurs Y1 et Y2 sur les GT1 *in vitro*, entraîne une libération de GnRH (Besecke *et al.*, 1994).

Compte tenu du fait que les cellules endothéliales expriment les récepteurs Y1 et Y2 au NPY et que leurs activations entraînent une sécrétion de NO (You *et al.*, 2001), notre hypothèse de travail a été de supposer que les cellules endothéliales de l'EM, indispensables à la libération de NO / GnRH, expriment ces récepteurs. Le NPY, dont la libération dans le système porte hypothalamo-hypophysaire augmente le jour du Pro (Sutton *et al.*, 1988), pourrait parallèlement activer ces récepteurs, et contrôler la libération de GnRH via le NO.

a) Dans un premier temps, nous avons étudié, par RT-PCR, l'existence de récepteurs Y1 et Y2 au NPY dans l'EM de rates.

b) Dans un deuxième temps, nous avons réalisé des mesures ampérométriques de NO sur des fragments d'EM de rates à 1600h en Pro et en présence d'antagonistes spécifiques des récepteurs Y1 ou d'antagonistes spécifiques des récepteurs Y2. Les conditions de mesures ampérométriques et de dosages de la GnRH sont similaires à celles décrites dans notre première étude.

Ce travail a abouti à une publication dans *Neuroreport* (2001, 12(15) :3365-3369).

**Involvement of NPY Y2 receptor subtype in the control of the spontaneous NO / GnRH
release at the rat median eminence**

Claude Knauf, Myriam Mariot-Tran Van Chuoi, Jean-Luc Jirou-Najou, Geneviève Mortreux,
Jean-Claude Beauvillain, and Dominique Croix

Neuroreport, 2001, 12(15): 3365-3369

Involvement of NPY Y2 receptor subtype in the control of the spontaneous NO/GnRH release at the rat median eminence

Claude Knauf,^{CA} Myriam Mariot Tran Van Chuoi,
Jean-Luc Jirou-Najou,¹ Genevieve Mortreux, Jean-Claude Beauvillain and Dominique Croix

INSERM U422, IFR22, Unité de Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuronale, 1 Place de Verdun, 59045 Lille Cedex;
¹Boehringer-Ingelheim France, 51100 Reims, France

^{CA}Corresponding Author

Received 9 July 2001; accepted 15 August 2001

The role of nitric oxide (NO) from vascular endothelium in the control of GnRH release at the median eminence (ME) level is well established. Interactions between NPY receptor/endothelium/nitric oxide are clearly demonstrated. While several studies implicate NPY Y1 receptor in the control of GnRH/LH at the time of the preovulatory LH surge, our results also

demonstrate the importance of NPY Y2 receptor in the control of GnRH release via endothelial NO. We conclude that NPY may be one of the elements implicated in the generation of the spontaneous NO/GnRH via Y2 receptor located on endothelium. *NeuroReport* 12:3365-3369 © 2001 Lippincott Williams & Wilkins.

Key words: Endothelium; GnRH; Median eminence; Nitric oxide; NPY Y receptor

INTRODUCTION

Several findings have indicated that NPY is implicated in the control of reproductive function. NPY stimulates GnRH release from medial basal hypothalamus *in vitro* [1], and is secreted into the hypophysal portal circulation to modulate GnRH-induced LH secretion [2]. Intracerebral and peripheral immunoneutralization studies have also shown that endogenous NPY, both in the hypothalamus [3] and at the level of the pituitary gland [2] are requisite for the elaboration of the GnRH/LH surge. Another experiment has established that exogenous NPY exerts a stimulatory effect on GnRH release at the ME in a steroid-dependent manner [4]. During the estrous cycle, the proestrus day is marked by an increase in NPY concentrations in the ME [5] which stimulates the GnRH/LH surge [6]. Finally, high levels of NPY are detected in the hypophysal portal vessel plasma in the afternoon of proestrus [2].

The action of NPY on GnRH release could essentially occur via two NPY receptor subtypes. While the NPY Y1 receptor is known for its stimulatory effect on GnRH terminals [7], the role of the Y2 receptor subtype in this system is controversial. Because of its presynaptic effect [8], Y2 receptor has been frequently associated with inhibitory actions. However, some Y2-mediated stimulatory effects of NPY on GnRH release have been demonstrated in GT1 immortalized hypothalamic cell line [9] and in GnRH terminals in goldfish [10].

Recently, a new concept has emerged implicating endothelial cells, via nitric oxide (NO) secretion, in neuroen-

doctrinal functions [11]. At the external zone of the ME, NO is essentially formed by endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and is released in a spontaneous, pulsatile and cyclic manner across the estrous cycle [12]. Several results suggest that NPY receptors might be implicated in this spontaneous release. First, several reports show that endothelium contains both NPY Y1 and Y2 receptor subtypes [13]. Second, activation of endothelial NPY receptors provokes the synthesis and release of NO [13].

To investigate the part played by NPY in the spontaneous release of NO via Y1 and Y2 receptor, we first examined the presence of Y1 and Y2 receptor in the ME of rats by RT-PCR studies. We then used *ex vivo* techniques coupled with amperometric measurements and RIA assays to determine the influences of NPY Y1 and Y2 receptor specific antagonists on the NO/GnRH release from 16:00 h proestrus ME, at the moment of the GnRH surge.

MATERIALS AND METHODS

Animals: All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC). Vaginal lavage of female Wistar rats was examined daily and only rats that exhibited at least two consecutive 4 day estrous cycles were used for the present experiment. Female rats were killed by decapitation at 16:00 h on proestrus (Pro). After rapid removal of the brain, the ME and associated vascular tissues were dissected under a binocular magnifying glass as described in detail previously [12].

RESULTS

Reverse transcriptase-PCR was used to examine the expression of the NPY-Y1 and NPY-Y2 receptor mRNA in ME of female rats (Fig. 1). β -actin expression was homogeneous in the samples investigated. PCR products of the expected size (546bp) for NPY-Y1 and (501bp) for NPY-Y2 were

detected in ME of each animal. No PCR product was amplified within RT negative control. This data was obtained in two independent experiments and demonstrated that mRNA encoding NPY receptor β mes is expressed at the level of ME.

Using an amperometric recordings, our previous *ex vivo*

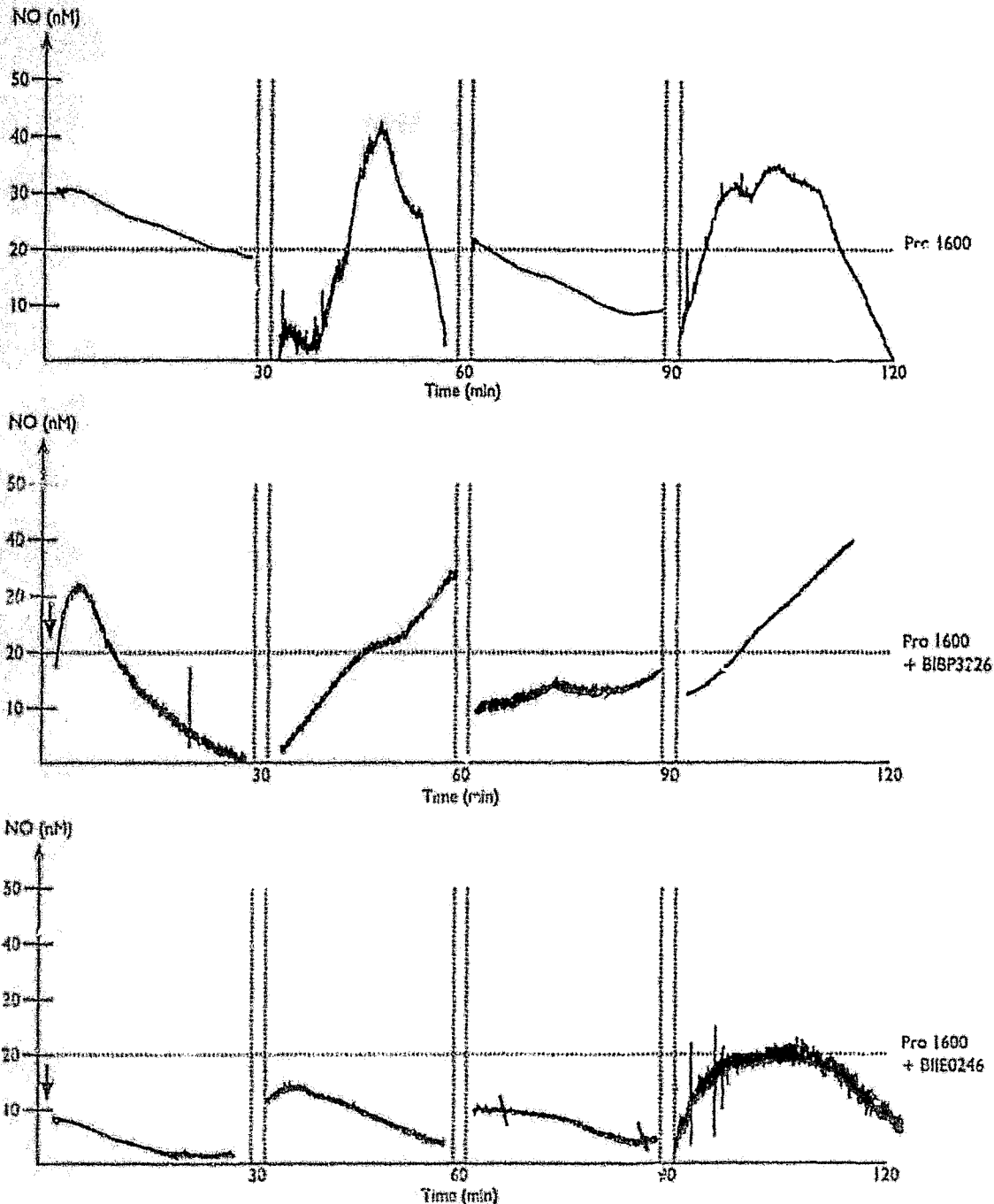


Fig. 2. Characteristic amperometric measurements for three individual animals: one Pro 1600h ME, one Pro 1600h ME treated with BIBP3226 (NPY-Y1 receptor antagonist), one Pro 1600h ME treated with BIE0246 (NPY-Y2 receptor antagonist) for each graph, the four periods of 30 min represent one complete measurement for only one animal. Antagonist was added from the first change of the medium (as indicated by arrow), just after the 30 min recovery-period (not illustrated in this figure). Vertical dashed bars represent the changes of the medium.

NO/GnRH pulsatility in the ME. Consequently, we surmise that spontaneous NO pulsatility implicated in the GnRH release might at least be linked to NPY pulsatility via an action on Y2 receptors. This action on Y2 is not contradictory to previous results showing that NPY might induce GnRH release at the ME through Y1 receptors [5,24]. In fact, NPY beside its action on endothelial Y2 receptors, might also act on Y1 receptors located in GnRH nerve endings. In favor of this point is the fact that Y1 receptors and not Y2 receptors have been visualized on rat GnRH nerve endings suggesting a paracrine action of NPY at this level via Y1 receptors. However, it must be mentioned that Y2 receptors have been observed in GT1 cells [9]. Y1 receptors located on endothelial cells of the ME may be implicated in other signaling process which remained to be identified.

At the ME, the presence of NO is crucial to conserve a GnRH activity [11]. Our result show that Y1 receptor is not implicated in the NOergic pathway. We suppose that blockade of the Y1 receptor in our system did not perturb the NO activity, and consequently, GnRH release. On the other hand, the Y2 receptor transduction pathway may be directly linked to NO. Experiments implicated NPY/Y1 in controlling GnRH secretion were performed from hypothalamic fragments treated with exogenous NPY, which may stimulate the Y1 receptors located on GnRH terminals [18]. In accordance with our study, Xu *et al.* [18] demonstrate that BIBP3226 was without effect on *in vitro* spontaneous GnRH release. This result suggest that, in absence of exogenous NPY, GnRH secretion may be influenced by other NPY receptors than NPY Y1. Our study deals only with the effect of endogenous NPY.

CONCLUSION

NPY is a crucial element in the control of GnRH activity. At the ME, NPY may stimulate GnRH release via direct interactions with Y1 receptors located on GnRH nerve endings, or an activation of NO release by stimulation of Y2 receptors located on the vascular endothelium. To our

knowledge, this work constitutes the first observation of the implication of Y2 receptors in the control of GnRH release in mammals.

REFERENCES

1. Crowley WR and Kalra SP. *Neuroendocrinology* 46, 97-103 (1987).
2. Sutton SW, Toyama TT, Otto S and Plotsky PM. *Endocrinology* 123, 1209-1210 (1988).
3. Wehrenberg WB, Corder R and Gaillard RC. *Neuroendocrinology* 49, 680-682 (1989).
4. Sabatino FD, Collins P and McDonald JK. *Endocrinology* 124, 2089-2098 (1989).
5. Sahu A, Jacobson W, Crowley WR and Kalra SP. *J Neuroendocrinol* 1, 83-87 (1989).
6. Besocke LM and Levine JE. *Endocrinology* 135, 63-66 (1994).
7. Kalra SP, Fuentes M, Fournier A *et al.* *Endocrinology* 130, 3323-3330 (1992).
8. Potter EK, Mitchell L, McCloskey MJ *et al.* *Reg Pept* 25, 167-177 (1989).
9. Besocke LM, Wolfe AM, Pierce ME *et al.* *Endocrinology* 135, 1621-1627 (1994).
10. Peng C, Chang JP, Yu KL *et al.* *Endocrinology* 132, 1820-1829 (1993).
11. Prevot V, Bouret S, Stefano GB and Beauvillain JC. *Brain Res Rev* 34, 27-41 (2000).
12. Knauf C, Prevot V, Stefano GB *et al.* *Endocrinology* 142, 2343-2350 (2001).
13. You J, Edvinsson L and Bryan RM Jr. *J Cerebr Blood Flow Metab* 21, 77-84 (2001).
14. Chomczynski P and Sacchi N. *Anal Biochem* 162, 156-159 (1987).
15. Nudel U, Zakut E, Shani M *et al.* *Nucleic Acids Res* 11, 1759-1771 (1983).
16. Goumain M, Veisier T, Lorinet AM and Laburthe M. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 52-56 (1998).
17. St-Pierre JA, Dumont Y, Nouel D *et al.* *Dr J Pharmacol* 123, 183-194 (1998).
18. Xu M, Urban JH, Hill JW and Levine JE. *Endocrinology* 141, 3319-3327 (2000).
19. Doods H, Gaida W, Wieland HA *et al.* *Eur J Pharmacol* 384, R3-5 (1999).
20. Prevot V, Croix D, Rialas CM *et al.* *Endocrinology* 140, 652-659 (1999).
21. Prevot V, Rialas CM, Croix D *et al.* *Brain Res* 790, 236-244 (1998).
22. Li C, Chen F and Smith MS. *Endocrinology* 140, 5382-5390 (1997).
23. Waller MJ, McDonald JK, Reboussin DM and Terasawa E. *Endocrinology* 132, 2333-2342 (1992).
24. Leupen SM, Besocke LM and Levine JE. *Endocrinology* 138, 2735-2739 (1997).

Acknowledgements: This work was supported by the University of Lille II, the FEDER (LARC network), the CHRU of Lille, and the Region Nord-Pas-de-Calais.

Description rapide des résultats

Par RT-PCR, nous avons démontré la présence des récepteurs Y1 et Y2 au NPY dans l'EM de rates.

L'ajout dans le milieu de survie d'un antagoniste du récepteur Y1 au NPY n'a pas provoqué de diminution significative de la libération de NO / GnRH par l'EM. Le récepteur Y1, qui serait présent au niveau des cellules endothéliales de l'EM, pourrait être impliqué dans d'autres voies de signalisation.

Par contre, l'inhibition du récepteur Y2 a entraîné une baisse significative de l'activité NO / GnRH dans l'EM de rates au stade Pro1600h. Le récepteur Y2 aurait donc un rôle majeur dans le contrôle de la sécrétion de la GnRH via le NO.

On peut donc penser que l'action stimulatrice du récepteur Y1 sur la sécrétion de la GnRH se ferait essentiellement au niveau des terminaisons nerveuses des neurones à GnRH (Kalra *et al.*, 1992).

Bien que ce travail ne remette pas en doute l'importance du récepteur Y1, il est le premier à : 1) impliquer le récepteur Y2 dans le fonctionnement du système à GnRH, et 2) démontrer une voie de communication NPY récepteur / endothélium / NO / GnRH dans l'EM.

2) Implication de la galanine dans le système NO / GnRH

La galanine est fortement exprimée dans l'EM (Rokaeus *et al.*, 1984). Elle peut être coexprimée avec la GnRH et stimuler sa libération (Merchenthaler *et al.*, 1990). Sa fréquence de libération est similaire à celle de la GnRH, et les pulses de galanine apparaissent soit en même temps, soit avant les pulses de GnRH (Lopez *et al.*, 1991). La libération de la galanine dans le sang porte hypophysaire est maximale le jour du Pro.

Compte tenu de ces informations, nous avons supposé que la galanine serait capable de stimuler une libération de NO au niveau de l'encéphélim, entraînant une libération de GnRH.

a) Nous avons, dans un premier temps, étudié la présence des récepteurs à la galanine par RT-PCR, à savoir : GalR1, GalR2 et GalR3 dans l'EM. L'étude par Western Blot de l'expression de ces récepteurs n'a pu être réalisée. En effet, aucun anticorps anti-récepteur à la galanine ne fonctionne dans nos conditions expérimentales.

b) Dans un deuxième temps, nous avons réalisé des mesures ampérométriques de NO sur des EM de rats mâles en présence de galanine aux concentrations 100 et 500 nM, selon un protocole établi au laboratoire (Prevot *et al.*, 1999b). D'autres mesures ont été réalisées dans les mêmes conditions, en présence de L-NIO (5.10^{-7} M) ou de galantide (antagoniste des récepteurs à la galanine). Les taux de GnRH présents dans le milieu de survie sont dosés par RIA.

**Stimulation of GnRH release by galanin at the rat median eminence :
a possible NO-dependent and NO-independent transduction pathway**

Claude Knauf, Myriam Mariot-Tran Van Chuoi, Xavier d'Anglemont de Tassigny,
Valérie Mitchell, Geneviève Mortreux, Jean-Claude Beauvillain, and Dominique Croix

En préparation

**Stimulation of GnRH release by galanin at the rat median eminence :
a possible NO-dependent and NO-independent transduction pathway**

Claude Knauf^{CA}, Myriam Mariot-Tran Van Chuoi, Xavier d'Anglemont de Tassigny,
Valérie Mitchell, Geneviève Mortreux, Jean-Claude Beauvillain, and Dominique Croix

INSERM U422, IFR22, Unité de Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuronale,
1 Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

^{CA}Corresponding Author



ABSTRACT

At the median eminence (ME), the implication of endothelium in the control of neuroendocrine secretion via nitric oxide (NO) is well established. Galanin, a peptide largely represented at the level of the hypothalamus, may be present in gonadoliberein releasing hormone (GnRH) neurons, and secreted at a frequency similar to that of GnRH. Our results demonstrate that galanin stimulate a NO production. These results suggest that galanin is very important in controlling GnRH release at the ME level. We conclude that galanin may act via two signal transduction pathway : a possibly NO-dependent and a NO-independent way.

Key words: Galanin ; Galanin receptors ; GnRH ; Nitric oxide ; Median eminence.

INTRODUCTION

Galanin, a peptide isolated first from pig intestines [1], has been implicated in many biological effects such as food intake, sexual behavior, reproductive functions, insulin release [2]. The actions of galanin are mediated by at least three G-protein-coupled receptors termed galanin receptor type 1 (GalR1), galanin receptor type 2 (GalR2), and galanin receptor type 3 (GalR3) [3].

In the brain, galanin is largely represented in the hypothalamus [3], and in particular, at the level of the median eminence (ME) external zone [4], where GnRH terminals are also located [5]. By using double-labeling immunocytochemistry, Merchenthaler *et al.* demonstrated that approximately 20 % of male [6] and 65 % of female GnRH cells [7] were also immunopositive for galanin. Moreover, galanin is widely implicated in the control of gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons activity since : 1) galanin stimulates GnRH release from hypothalamic medio-basal fragments [8], and 2) galanin secretion appears to be pulsatile, at a frequency similar to that of GnRH [9]. These galanin pulses either were coincident with those of GnRH or preceded them [9].

Nitric oxide (NO), a gaseous neurotransmitter, is also implicated in the control of GnRH release at the ME external zone [10]. At this level, the role of vascular endothelial cells is clearly demonstrated [10-14]. ME fragments may generate endothelial NO / GnRH release in response to exogenous substances such as estradiol [13] or in a spontaneous manner [10]. At the ME, variations of the expression of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) across the estrous cycle are associated with the variations in the NO / GnRH release measured by amperometry [10, 11]. Indeed, eNOS mRNA and protein are increased from 0800h proestrus (Pro) to 1600h Pro, at the moment of the NO / GnRH maximal release [10]. Moreover, the stage of 1600h Pro is marked by a decrease in the level of caveolin-1 protein at the ME, which inhibits eNOS [11], suggesting that high NO releases are due to an inverse mode of regulation of these two interactive proteins. The importance of eNOS in neuroendocrine secretions is reinforced by the fact that intracerebroventricular injection of eNOS antisense oligonucleotides is more efficacious than neuronal NOS (nNOS) antisense in inhibiting the estradiol / progesterone-induced GnRH / LH surge in ovariectomized female rats [14].

The main aim of our work was to know whether galanin might act on the GnRH release via an action on eNOS. To answer this question, we first examine the presence of the

three galanin receptors subtypes at the ME level by RT-PCR. Then, we investigate the effect of galanin, at different concentrations, on the NO / GnRH release from male ME rats by coupling amperometric measurements and radioimmunoassay. To verify the specificity of the phenomenon, we study the effects of the peptide in the presence of galantide, a non-specific galanin receptor antagonist, or in the presence of L-NIO, a preferential eNOS inhibitor at 5.10^{-7} M [15], on NO / GnRH induced release.

Our results show that 1) the three mRNA encoding galanin receptors subtypes are expressed at the ME ; 2) galanin induces a NO synthesis able to stimulate GnRH release ; and 3) galanin can also induce GnRH independently from NO pathway.

MATERIALS AND METHODS

Animals: Experiment were performed on male Wistar rats (CERJ, St Berthevin, France), weighing 300-350g, and house four per cage and given free access to food and water. All animals were subjected to fixed conditions of lighting (from 0500h to 1900h). All experiment were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86 / 609 / EEC). Rats were killed by decapitation. After rapid removal of the brain, the ME and associated vascular tissues were dissected under a binocular magnifying glass as previously described in details [13].

RNA preparation and analysis : Total RNA was isolated from ME of three male rats using TRIZOL Reagent (GibcoBRL, Life Technologies) according to Chomczynski and Sacchi [16]. After treatment with RNase-free DNaseI (Boehringer-Roche Diagnostics, France), the quantity and purity of total RNA was determined by the measure of the absorbance at 260/280 nm. cDNA was synthesized using 500 ng of total RNA, and Moloney Murine Leukaemia virus reverse transcriptase (GibcoBRL, Life Technology) following the manufacturer's guideline. RT negative control was performed by omitting reverse transcriptase from the reaction.

β -actin and GAL-R1, GAL-R2, GAL-R3 receptor genes were amplified by PCR using gene specific primers (Genset, France) presented in Table . . PCRs was performed on 50 ng of the cDNA using ampliTaq Gold (Perkin Elmer, Foster City, CA) under the following conditions: 1 cycle of denaturation at 94 °C for 7 min, 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, primer annealing for 1 min at 55 °C for β -actin, 57.5°C for GAL-R2 and 60°C for GAL-R1 and GAL-R3 and primer extension for 1.5 min at 72 °C using a Gene Amp PCR System

9700 (Perkin-Elmer Corporation, Foster City, CA, USA). Negative control was performed by omitting cDNA from the PCR reaction mix. Separation of PCR products was achieved by electrophoresis in 3% agarose gel. Intensities of PCR products were analyzed by videoimaging of ethidium bromide stained gels using Clura vision software.

Amperometric measurements: After dissection, the ME fragments were washed twice in Krebs-Ringer bicarbonate / glucose buffer (pH 7.4) containing 23 μ M bacitracin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in an atmosphere of 95 % O₂ - 5 % CO₂, and then immersed in Eppendorf tubes containing 800 μ l of the same medium. Each tube contained 3 ME fragments. After a 30 min recovery-period the medium was changed, and then, the spontaneous NO release was measured at 35°C for 1 period of 30 min by using a NO-specific amperometric probe (World Precision Instruments, Sarasota, FL) as previously described [12]. At the end of the first 30 min incubation-period (corresponding to the 30 min recovery-period), 600 μ l of medium was removed and replaced with 600 μ l of fresh Krebs-Ringer bicarbonate/glucose buffer. EDTA (10⁻² M final) was added to the removed medium. ME fragments were stimulated during the second 30 min incubation periods with various concentrations of galanin 1-29 (100 or 500 nM) in the absence or presence of galantide at 500 nM. The galanin effects on NO / GnRH release were also studied in the presence of L-NIO, a preferential eNOS inhibitor at 5.10⁻⁷M [15]. Data acquisition was performed by computer-interfaced DUO-18 software (WPI). The experimental values were then transferred to Sigma-Plot and Sigma-Stat (Jandel, San Rafael, CA) for graphic representation and evaluation.

GnRH radioimmunoassay: GnRH concentrations were measured in the medium for each 30 min incubation period for each animal of any experimental design in duplicate by radioimmunoassay (RIA), as previously described [13].

Statistical analysis: All experiments were repeated a minimum of 4 times, i.e., a minimum of four animals was run for each experimental condition. To facilitate the comparison of NO release during the different treatments, the area under the curve (AUC) was calculated for the second 30 min incubation-period. Each NO peak was also characterized by the maximal amplitude, the duration and the time of latency. Concerning the effects of drugs on GnRH release, we calculated the ratio of the GnRH concentration of the second 30 min incubation (corresponding to the effect of the drug on to GnRH release) to the first one (corresponding to the control tube). All data are presented as the mean \pm SEM. Data were analyzed by one-way

ANOVA. Student-Newman-Keuls multiple comparison was used post hoc to find significant differences between groups.

RESULTS AND DISCUSSION

Reverse transcriptase-PCR was used to examine the expression of the GalR1, GalR2, GalR3 in male rats (Fig. 1). Housekeeping gene expression, β -actin, was homogenous in the samples investigated. PCR products of the expected size (350 bp) for GalR1, (672 bp) for GalR2 and GalR3 (327 bp) were detected in ME of each animal. No PCR product was amplified within RT negative control. This data demonstrated that mRNA encoding galanin receptor genes are expressed at the level of ME.

Our results clearly demonstrated that galanin 100 or 500 nM was able to stimulate NO release from ME (Fig. 2 and 3). AUC was significantly increase with galanin 500 nM (2.4 ± 0.4 , arbitrary unit). This effect of galanin was antagonised by galantide (AUC : 0.9 ± 0.4 , arbitrary unit) and L-NIO (AUC : 0.6 ± 0.4 , arbitrary unit). The latency time of the response was significantly increased by L-NIO (203.6 ± 44.3 sec). Maximal amplitude and duration were also affected by the addition of galantide (9 ± 3.7 nM ; 167.3 ± 19.1 sec).

Galanin was able to stimulate the GnRH release (Fig. 4, 130 ± 10 % at 100 nM and 150 ± 10 % at 500 nM). This effect is clearly abolished by galantide (80 ± 20 %), but the addition of L-NIO was without effect on GnRH secretion (160 ± 20 %).

Further evidences suggest that GnRH release at the ME is linked to that of galanin. Our study attempts to demonstrate a line of communication between galanin receptors, NO and GnRH. The fact that endothelium is implicated in neuroendocrine functions via the eNOS enzyme [10-14], and that galanin may stimulate the NOergic pathway [17] leads to suppose that endothelial cells at the ME express one or more galanin receptor subtypes. Our previous amperometric study reveals that maximal NO release is recorded on Pro day associated with GnRH release [10]. Consequently, our hypothesis was that the increase in galanin secretion observed on Pro day [18] might be implicated in the increase in NO / GnRH release, via stimulating endothelial receptors.

Effectively, the results show that galanin is able to induce a NO release in sufficient amount to produce a GnRH release. However, blockade of the eNOS activity succeeds in inhibiting the NO pathway stimulated by galanin, but failed on the GnRH release. As a

consequence, we may suppose that other transduction signal pathways are involved in the GnRH secretion induced by galanin. For example, galanin may act directly on GnRH terminals or indirectly via other neurotransmitter systems independent of NO to stimulate GnRH release. The possibility of direct actions on GnRH nerves endings is supported by the fact that mRNA for galanin receptors are present in the GnRH cells [19] and that binding sites are observed at the ME [20].

The absence of a decrease in GnRH secretion after L-NIO treatment does not signify that the galanin / NO / GnRH pathway is not involved in the normal physiology. There probably exists a contribution of several modes of action of galanin in the ME. Taking into account the fact that galanin is co-expressed in GnRH cells, galanin is a major neuropeptide controlling the release of GnRH. Many arguments [10, 11, 21, 22] indicate that NO is implicated in the GnRH pulse synchroniser, and our previous results suggest more precisely that NO might be an important element in the spontaneous release of GnRH [10, 22]. Therefore, we can speculate that galanin release might act : 1) first to potentialise GnRH secretion in individual nerves endings via galanin receptors localized on the GnRH terminals ; and 2) second to stimulate NO release in order to synchronize GnRH secretion by the different nerves endings. It is possible that the concentration of galanin used in our experiment masks the potential effect of galanin on the synchronous NO effect.

As a conclusion, our work shows that galanin is a crucial neuropeptide in controlling the release of GnRH at the ME. This action might occur via the three types of receptors since the mRNA are present at the ME. Different transduction signal pathways are possibly used by galanin : one using NO as an intermediate neurotransmitter and an other independent from NO production. Moreover, the galanin / NO / GnRH pathway might be implicated in the synchronization of GnRH release, and this latter way of regulation remains to be demonstrated.

REFERENCES

1. Tatemoto K, Rokacus A, Jornvall H, McDonald TJ, Mutt V. *FEBS Lett.* 164:124-128 (1983).
2. Crawley JN. *Regul Pept.* 59:1-16 (1995).
3. Branchek TA, Smith KE, Gerald C, Walker MW. *Trends Pharmacol Sci.* 21:109-117 (2000).
4. Arai R, Calas A. *Brain Res.* 562:339-343 (1991).

5. Merchenthaler I, Setalo G, Petrusz P, Negro-Vilar A, Flerko B. *Exp Clin Endocrinol.* 94:133-140 (1989).
6. Merchenthaler I, Lopez FJ, Negro-Vilar A. *Proc Natl Acad Sci.* 87:6326-6330 (1990).
7. Merchenthaler I, Lopez FJ, Lennard DE, Negro-Vilar A. *Endocrinology.* 129:1977-1986 (1991).
8. Lopez FJ, Negro-Vilar A. *Endocrinology.* 127:2431-2436 (1990).
9. Lopez FJ, Merchenthaler I, Ching M, Wisniewski MG, Negro-Vilar A. *Proc Natl Acad Sci.* 88:4508-4512 (1991).
10. Knauf C, Prevot V, Stefano GB, Mortreux G, Beauvillain JC, Croix D. *Endocrinology.* 142:2343-2350 (2001).
11. Knauf C, Ferreira S, Hamdane M, Mailliot C, Prevot V, Beauvillain JC, Croix D. *Endocrinology.* 142:4288-4294 (2001).
12. Prevot V, Bouret S, Stefano GB, Beauvillain J. *Brain Res Rev.* 34:27-41(2000).
13. Prevot V, Croix D, Rialas CM, Poulain P, Fricchione GL, Stefano GB, Beauvillain JC. *Endocrinology.* 140:652-659 (1999).
14. Aguan K, Mahesh VB, Ping L, Bhat G, Brann DW. *Neuroendocrinology.* 64:449-455 (1996).
15. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. *Br J Pharmacol.* 101:746-752 (1990).
16. Chomczynski P, Sacchi N. *Anal Biochem.* 162:156-159 (1987).
17. Consolo S, Uboldi MC, Caltavuturo C, Bartfai T. *Neuroscience.* 85:819-826 (1998).
18. Leibowitz SF, Akabayashi A, Alexander JT, Wang J. *Endocrinology.* 139:1771-1780 (1998).
19. Mitchell V, Bouret S, Prevot V, Jennes L, Beauvillain JC. *J Neuroendocrinol.* 11:805-812 (1999).
20. Dutriez I, Lagny-Pourmir I, Epelbaum J, Beauvillain JC. *Brain Res.* 753:36-46 (1997).
21. Terasawa E. *Vitam Horm.* 63:91-129 (2001).
22. Knauf C, Mariot-Tran Van Chuoi M, Jirou-Najou JL, Mortreux G, Beauvillain JC, Croix D. *Neuroreport.* 15: 3365-3369 (2001).

	Forward	Reverse
Gal-R1	5'-AACCTCCAGGGGAACCCAGG-3'	5'-CATAGCGATCCACAGACATCG-3'
Gal-R2	5'-CCTCGAAACGCGGCTGGCC-3'	5'-CTGTGCAGTTGGGAAGTG-3'
Gal-R3	5'-CTGTGGCAGTGCCTGTGATC-3'	5'-TGCCGCACAGCCAGGTACCT-3'
β -actin	5'-CAA TGT GGC TGA GGA CTT TG-3'	5'-ACA GAA GCA ATG CTG TCA CC-3'

Fig. 1: Expression studies of GalR1, GalR2 and GalR3. Total RNA (0.5 μ g) was purified from ME tissues of four female rats. Primers for β -actin and for galanin receptors generated the PCR derived products of 193 bp (β -actin), 350 bp (GalR1), 672 bp (GalR2) and 327 bp (GalR3).

Lanes 1-3: β -actin.

Lanes 5-7: GalR1 gene expression.

Lanes 9-11: GalR2 gene expression.

Lanes 13-15: GalR3 gene expression.

Lane 4, 8, 12, 16: NC PCR negative control.

Fig. 2: Schematic representation of a NO peak obtained by amperometric measurement: for one animal ; for one peak, we calculated the area under the curve (AUC, arbitrary unit), the duration (second), the maximal amplitude (nM) and the time of latency (second), as explained in the text.

Fig. 3: Histogram representation of the characteristic of NO peak (n = 4 for each conditions). *, significantly different from the column without an asterisk, $P < 0.05$.

Fig. 4: Histogram representation of α -MCH secretion (n = 4 for each conditions). *, significantly different from the column without an asterisk, $P < 0.05$. Data are represented by calculating the ratio of the tube corresponding to the effect of galanin (with or without drugs) to the control tube corresponding to the first 30 minutes-incubation period, as explained in the text.

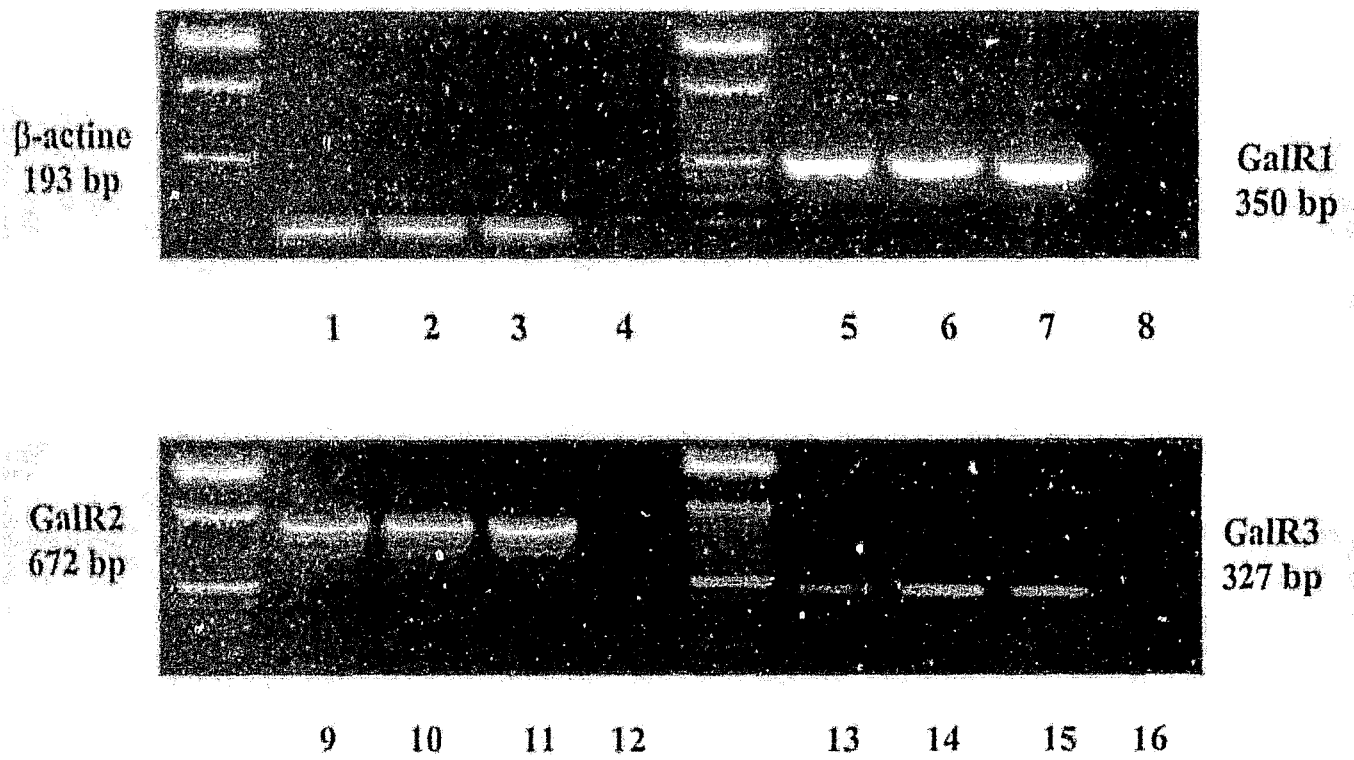


Figure 1

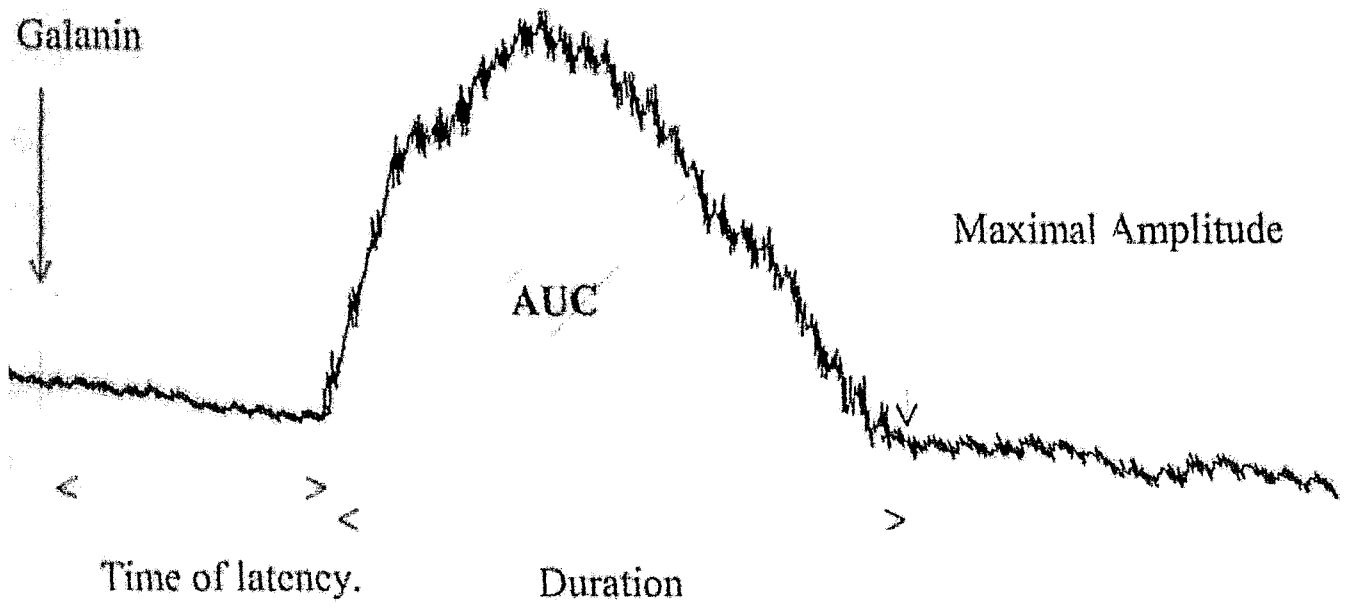
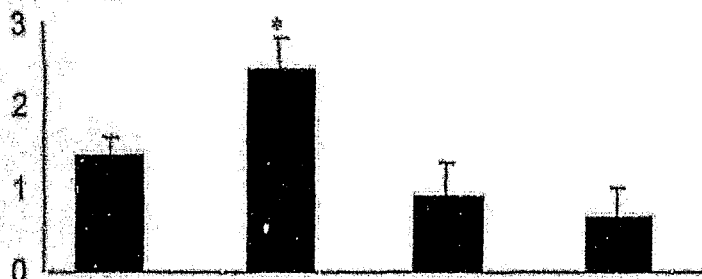


Figure 2

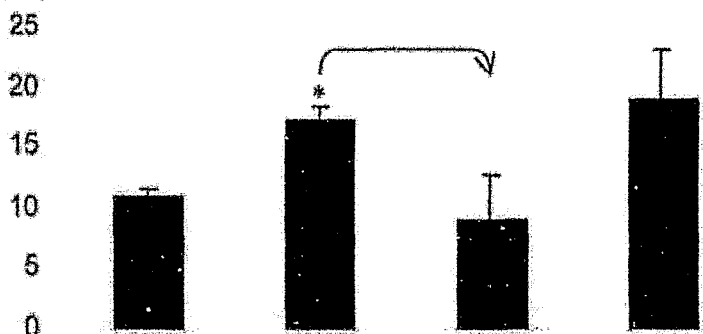
Figure 3

AUC



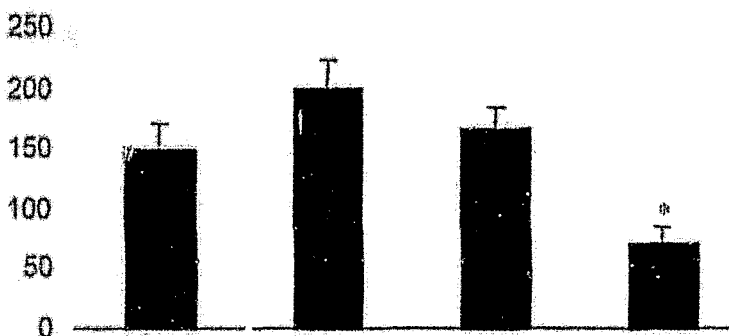
Galanine 100nM Galanine 500nM Galanine 500nM + Galantide 500nM Galanine 500nM + NIO 500nM

Maximal Amplitude (nM)



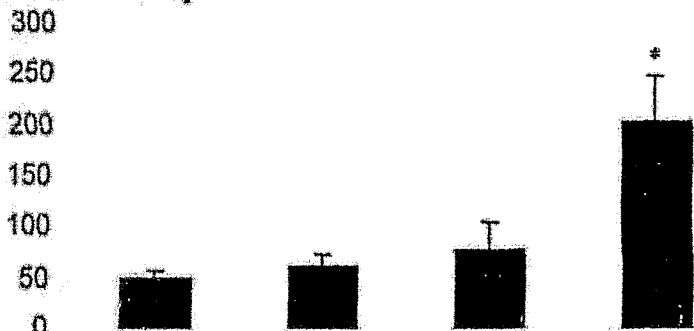
Galanine 100nM Galanine 500nM Galanine 500nM + Galantide 500nM Galanine 500nM + NIO 500nM

Duration (sec)



Galanine 100nM Galanine 500nM Galanine 500nM + Galantide 500nM Galanine 500nM + NIO 500nM

Time of latency



Galanine 100nM Galanine 500nM Galanine 500nM + Galantide 500nM Galanine 500nM + NIO 500nM

Ratio tube 2 / tube 1
(%)

200

150

100

50

0

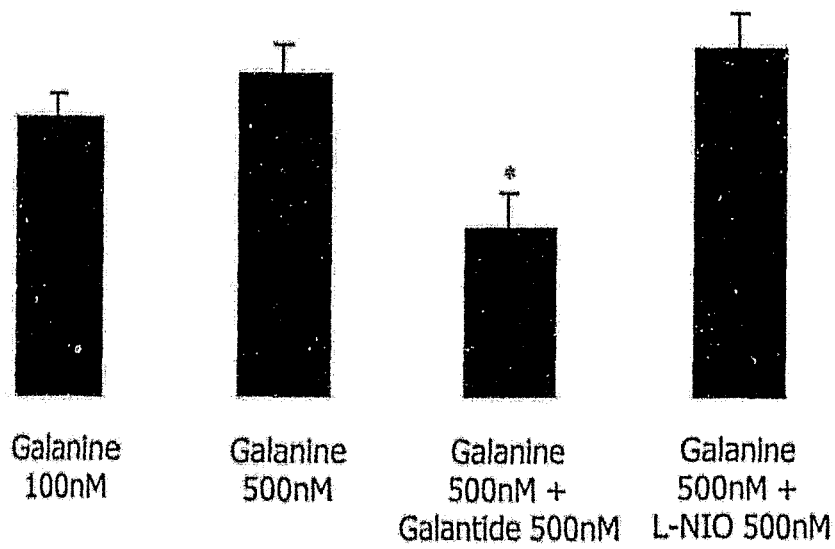


Figure 4

Description rapide des résultats

Ce travail nous a permis de détecter, dans l'EM, la présence des ARNm codant pour les trois types de récepteurs à la galanine, ce qui correspond à un résultat nouveau : jusqu' alors seuls des sites de liaison à la galanine avaient été décrits.

L'apport exogène de galanine sur des fragments d'EM de rat mâle entraîne des libérations de NO et de GnRH. Cet effet est spécifique de la galanine car il est antagonisé par la galantide. Cependant, l'ajout de L-NIO ($5.10^{-7}M$) dans le milieu de survie bloque la libération de NO, mais pas celle de GnRH.

Ce travail 1) laisse supposer que les cellules endothéliales de l'EM expriment une ou plusieurs formes de récepteurs à la galanine ; 2) montre que la galanine provoque une libération de la GnRH par l'EM ; 3) suggère que différentes voies de transduction peuvent être impliquées dans cette libération :

- a) via des récepteurs à la galanine localisés sur les terminaisons nerveuses à GnRH ou des terminaisons nerveuses voisines
- b) via une libération de NO. Cette dernière voie qui pourrait avoir un rôle de synchroniseur reste à étudier (voir discussion générale).

En résumé, ce travail montre que la galanine est capable de contrôler la libération de la GnRH par deux voies de transduction différentes : une voie dépendante du NO et une voie indépendante probablement plus directe.

RESULTATS DES CONTROLES ANNEXES

Pour valider notre système, d'autres mesures ampérométriques ont été réalisées sur des fragments d'EM de rates au stade Pro1400h, en présence d'hémoglobine à 2 µg / ml. L'hémoglobine, connue pour avoir des propriétés de chélateur de NO, a été ajoutée dans le milieu de survie lors de la montée d'un pic de NO. Ceci a entraîné une baisse importante de la sécrétion spontanée de NO pendant environ 30 minutes (FIGURE 10). Cette sécrétion de NO a repris avec une pente similaire à celle observée avant l'ajout de l'hémoglobine.

Des mesures ampérométriques ont été effectuées dans les mêmes conditions, en présence de L-NIO à $5 \cdot 10^{-7}$ M, lors de la montée d'un pic de NO. A cette concentration, le L-NIO inhibe préférentiellement la NOS endothéliale (Rees *et al.*, 1990). L'effet obtenu a été une diminution de la libération de NO pendant environ 20 minutes. Par la suite, nous avons observé un nouveau relargage de NO avec une pente similaire à celle observée avant l'ajout de l'inhibiteur (FIGURE 11).

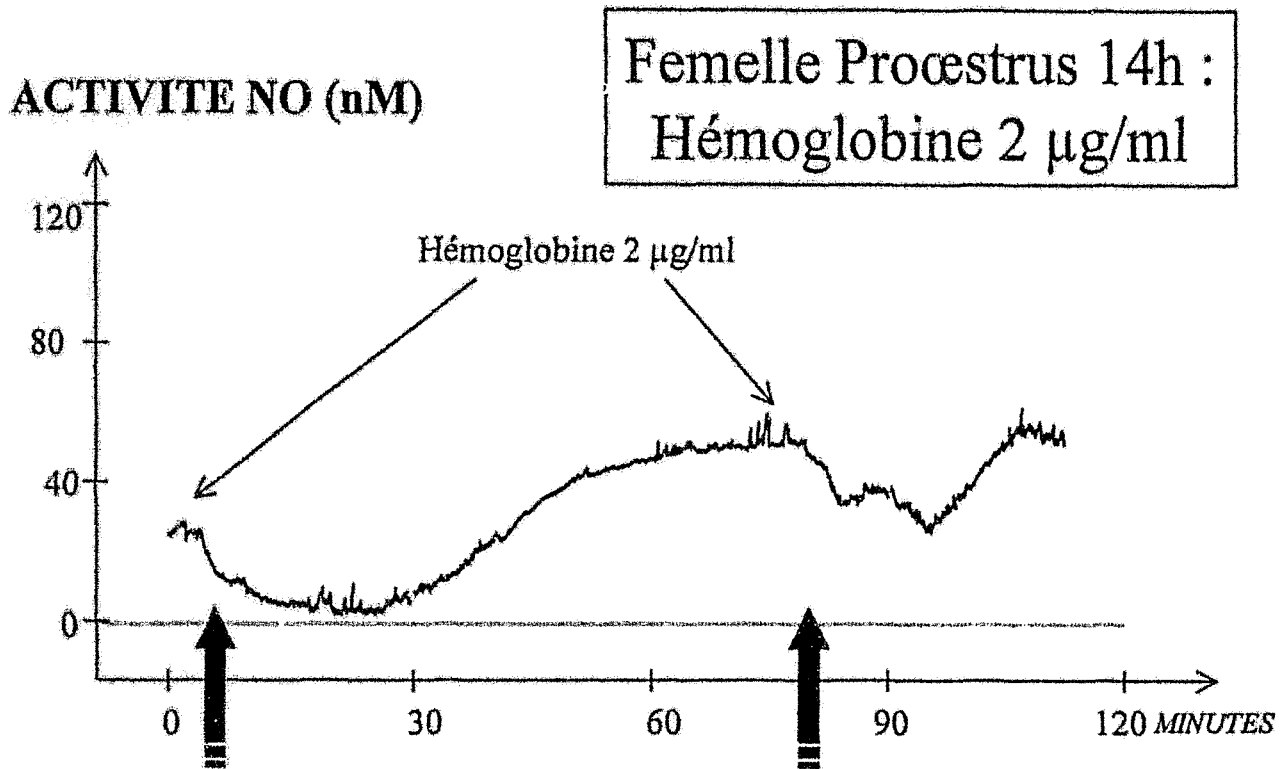


FIGURE 10. Effet chélateur de l'hémoglobine sur le NO libéré.

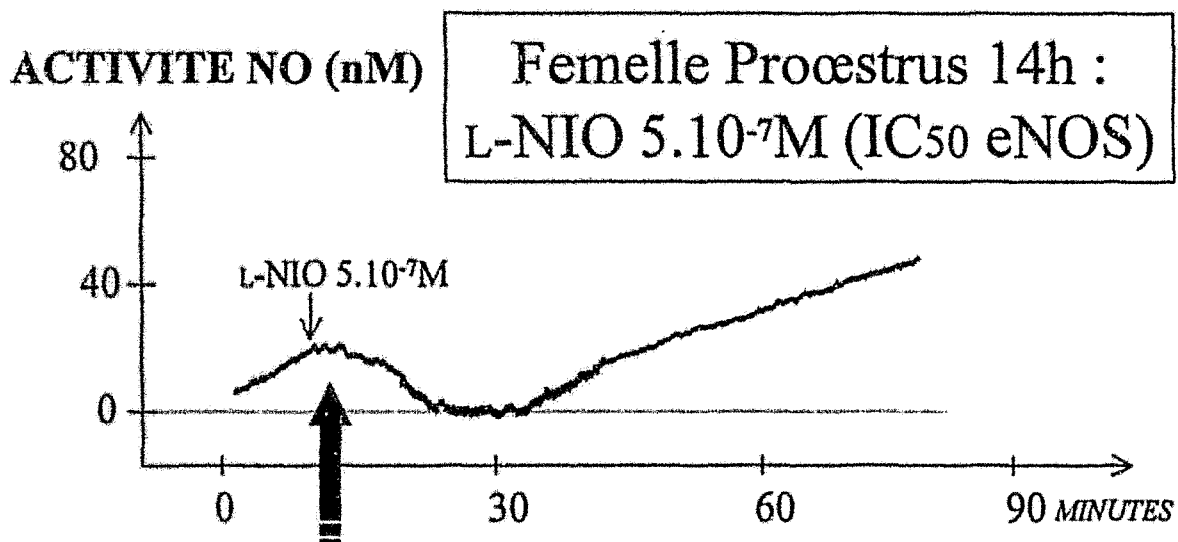


FIGURE 11. Effet inhibiteur du L-NIO sur la libération spontanée de NO lors d'une montée d'un pic de NO.

REVUE

**Nitric oxide secretion from median eminence endothelial cells is involved
in the control of GnRH release**

Vincent Prevot, Claude Knauf, George B. Stefano, Dominique Croix,
and Jean-Claude Beauvillain

Recent Research Developments in Endocrinology, 2001, Vol. 2 : sous presse

NITRIC OXIDE SECRETION FROM MEDIAN EMINENCE ENDOTHELIAL CELLS IS INVOLVED IN THE CONTROL OF GnRH RELEASE

VINCENT PREVOT¹, CLAUDE KNAUF¹, GEORGE B STEFANO², DOMINIQUE
CROIX¹, JEAN-CLAUDE BEAUVILLAIN¹

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 422, IFR 22, Unité de
Neuroendocrinologie et de Physiopathologie Neuronale, 59045 Lille cedex, France.

² Neuroscience Research Institute, State University of New York, Old Westbury New
York 11568, USA.

Running title: Endothelial NO and GnRH release

**Address all correspondence and requests for reprints to: Vincent Prevot, INSERM
U422, Place de Verdun, 59045 Lille cedex, France. E-mail: prevot@lille.inserm.fr**

**NITRIC OXIDE SECRETION FROM MEDIAN EMINENCE
ENDOTHELIAL CELLS IS INVOLVED IN THE CONTROL
OF GnRH RELEASE**

VINCENT PREVOT¹, CLAUDE KNAUF¹, GEORGE B STEFANO², DOMINIQUE
CROIX¹, JEAN-CLAUDE BEAUVILLAIN¹

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 422, IFR 22, Unité de
Neuroendocrinologie et de Physiopathologie Neuronale, 59045 Lille cedex, France.

² Neuroscience Research Institute, State University of New York, Old Westbury New
York 11568, USA.

Running title: Endothelial NO and GnRH release

**Address all correspondence and requests for reprints to: Vincent Prevot, INSERM
U422, Place de Verdun, 59045 Lille cedex, France. E-mail: prevot@lille.inserm.fr**

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a critical modulator involved in the hypothalamic control of the reproductive function. Evidence is presented demonstrating that NO, as a diffusible signaling molecule, may function as a synchronizing link to anatomically clustered GnRH neurons. Consistent with this functional role, recent *ex vivo* studies involving the median eminence of the hypothalamus, the projection site of GnRH neurons, indicate that NO is spontaneously secreted by this structure in a pulsatile and cyclic manner in female rats. The median eminence NO release activity peaks on the day of the ovulation of the preovulatory GnRH/LH surge, i.e., on proestrus. The blockade of the increase of NO effluxes on proestrus by nitric oxide synthase inhibitors suppresses the massive GnRH release by the median eminence fragments, demonstrating that GnRH and NO release are intimately linked at the median eminence. The identification of the source of NO at the median eminence appears to be mainly endothelial in origin. These findings shed light

on unexpected modulatory mechanisms involving endothelial cell-to-neuron communication processes in the regulation of the GnRH neuroendocrine axis.

INTRODUCTION

Critical for the mammalian female reproductive function is the cyclic activation of hypothalamic gonadotropin releasing hormone (GnRH) secretion. GnRH is a neurohormone synthesized in neuronal cell bodies diffusely distributed in the preoptic region in rodents. These GnRH neurons project to the external zone of the median eminence of the hypothalamus, where they release their secretory product into the pituitary portal blood vessels from their neuroendocrine terminals. GnRH is then transported to the anterior pituitary where it modulates the secretion of gonadotropins (LH and FSH), which regulate gonadal function. There is evidence that nitric oxide (NO), a gaseous signal molecule formed during the conversion of L-arginine to L-citrulline by NO synthase (NOS) enzymes, is a critical component for the regulation of GnRH release at the median eminence both *in vitro*

in vivo (see for Review [1]). The present review will review recent investigations performed at the median eminence to delineate the basis of a new concept in endocrinology that is the involvement of endothelial cell-to-neuron signaling in the role of GnRH release. Such a communication pathway involved in the role of neurosecretion appears to operate through NO release. The role of NO in the role of pulsatile and cyclic GnRH release will first be summarized. The implication of adrenal steroids in the regulation of median eminence NO release also will be addressed. In addition, the endothelial origin of the NO implicated in the modulation of GnRH release at the median eminence will be discussed. Finally, the putative cellular mechanisms involved in the control of the endothelial NOS activity throughout the rat estrous cycle will be discussed.

DOES MEDIAN EMINENCE NITRIC OXIDE SECRETION CONTRIBUTE TO THE SYNCHRONIZATION OF GnRH RELEASE?

The importance of NO signaling in the control of GnRH/LH release has been demonstrated by different groups [2-4] shortly after the discovery that NO might have a neural role [5] and that it was mainly produced in the brain by neurons located in the hypothalamus [6]. The putative implication of NO in the synchronization of GnRH neuron releasing activity was first suggested by *in vitro* studies led on neuronal cell lines (GT1 cells) that release GnRH on a pulsatile mode [7]. This GnRH-secreting cell line expresses both the endothelial NOS (eNOS) [8] and the neuronal NOS (nNOS) [7,8]; two NOS isoforms that are constitutively expressed and that are calcium and calmodulin dependent [10]. The addition of NOS inhibitors or of NO scavengers in the culture medium of GT1 neurons leads to an inhibition of the pulsatile GnRH release from this immortalized cell line

[7], showing that *in vitro* NO is a neurotransmitter capable to set GnRH neurons in phase to establish synchronized GnRH secretion. *In vivo*, hypothalamic GnRH neurons do not appear to express neither nNOS [11,12] nor eNOS [1]. Therefore, the source of NO controlling GnRH secretion [2,4,13,14] must be exogenous to GnRH neurons. At the preoptic area, some spontaneous variations of extracellular cGMP, an index of NO release, have been monitored suggesting that NO may regulate GnRH secretory activity at the cell body [15]. Nevertheless, this NO of neuronal origin is unlikely to be the synchronizing link between the anatomically scattered GnRH neurons since the neurons expressing the nNOS are only closely associated to a small subset of GnRH neurons located in the diagonal bands of Broca and the rostral part of the preoptic area [12]. nNOS neurons may rather relay stimulatory or inhibitory influences to GnRH neurons, as is the case for glutamatergic [16] and β -endorphin [17,18] influences. Conversely, at the projection field of the GnRH neurons, the use of amperometric probes selectively measuring NO release in real time showed that median eminence fragments were secreting spontaneous bursts of NO that were correlated to GnRH release [19]. NO effluxes measured in median eminence fragments from female rat were pulsatile with an average frequency of a burst every 32 ± 1 min and a duration of 21 ± 2 min. Of major interest is the fact that the amplitude of NO secretion varied significantly across the estrous cycle (Fig.1). Nadir NO levels were measured on diestrus II. NO secretion increased markedly on the morning of proestrus to reach a maximum on proestrus 16h and was followed by a dramatic decrease of NO releasing activity at proestrus 18h. NO levels returned to basal values on estrus. While NO peak concentrations rarely exceeded 20 nM on diestrus and estrus, they were reaching 30 to 50 nM on proestrus. The strong inhibition

both NO and GnRH release upon the addition of a NOS inhibitor into the incubation medium [19] suggests that the pulsatile and tonic NO release from median eminence fragments might play a

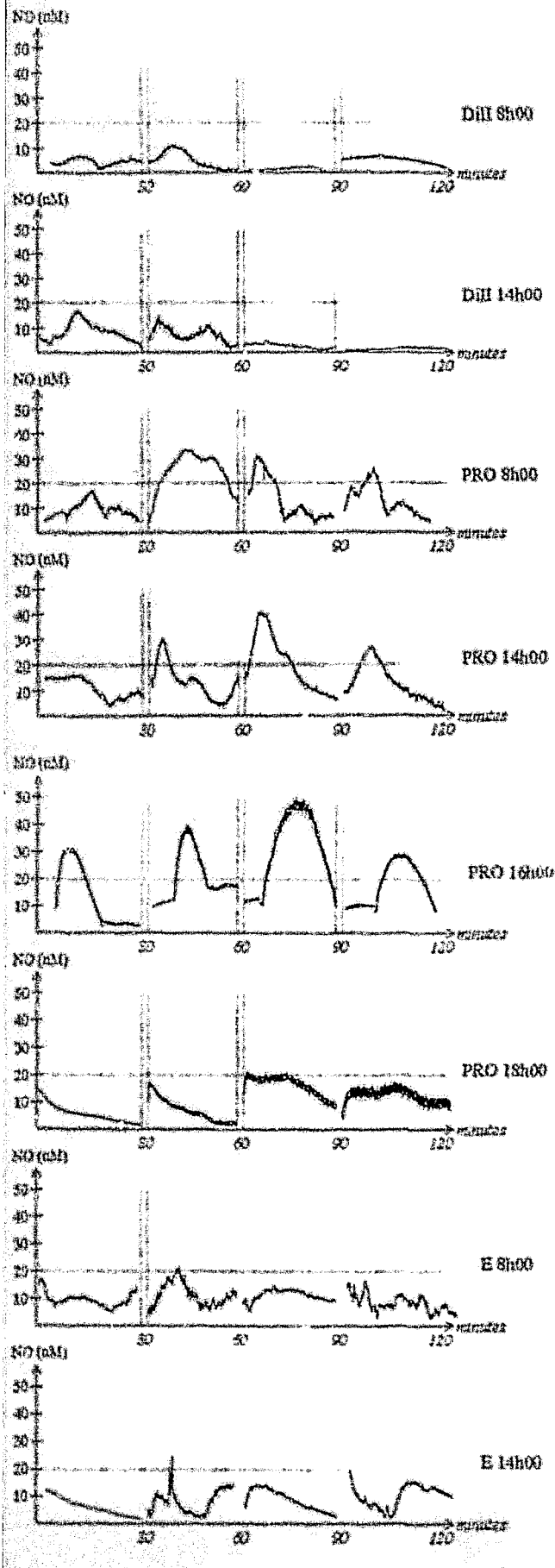


Fig. 1. Real-time measurement of spontaneous NO release from median eminence fragments at different stages of the estrous cycle in the female rat by amperometry. DiII, diestrus II; PRO, proestrus; E, estrus. From Ref. [19], with permission.

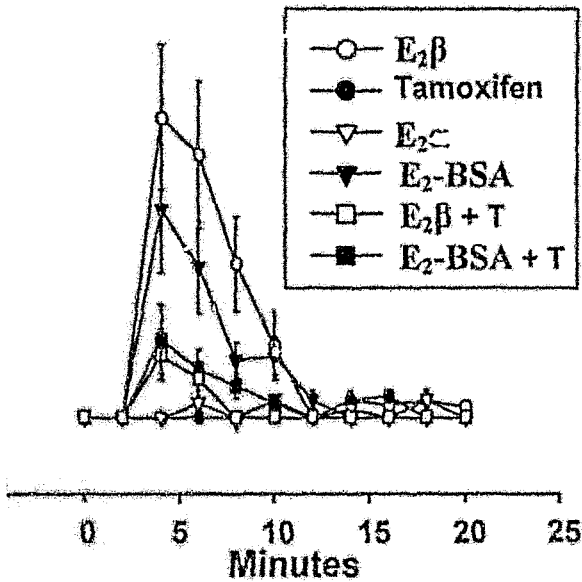
crucial role in the synchronization of GnRH release from the GnRH neuroendocrine terminals spread out over more than 2 mm within this hypothalamic area. The fact that mediobasal hypothalamus and/or median eminence fragments *ex vivo*, lacking GnRH cell bodies, have been shown to release GnRH on a pulsatile mode [20-22] with a frequency comparable to the one observed *in vivo* [23,24] that is strikingly similar to the frequency of pulsatile NO release, strengthens this hypothesis. Altogether these findings indicate that at least part of the mechanism synchronizing GnRH secretion resides within the median eminence and involves local NO release.

ACTIVATION OF MEDIAN EMINENCE NITRIC OXIDE RELEASE BY ESTROGEN

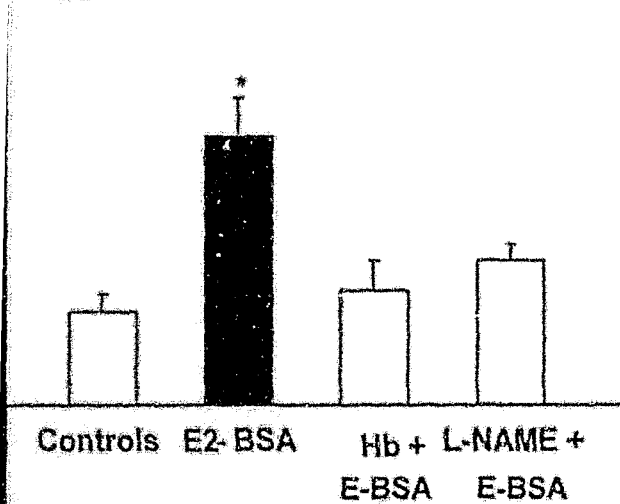
Acute estrogen-stimulated NO release. To begin to determine the basis of rapid estrogen effects on NO production at the median eminence, studies were performed in male median eminence fragments. This male median eminence fragment model was used because male rats have low estrogen levels but comparable estrogen receptor expression as females [25-29]. NO releasing activity was determined on freshly dissected median eminence fragments by amperometry [30]. This approach provides a direct assessment of the acute activation of existing NOS, keeping signal transduction mechanism intact [30]. The acute effect of 17β -estradiol ($E_2\beta$) on NO secretion is shown in Fig. 2. NO release measured during 20-min-incubation periods rose dramatically within 2-5 min after the addition of $E_2\beta$ (Fig. 2A) in a dose-dependent manner [30], with a threshold concentration of

M and a maximal effect at 10^{-8} M $E_2\beta$. $E_2\alpha$, a less active stereoisomer of gen, neither testosterone, the main steroid one controlling reproduction in the male, an effect on NO release over the same entration range.

c Oxide (nM \pm SEM)



GnRH (pg/3 median eminences)



2. Rapid effect of $E_2\beta$ on NO/GnRH release from median eminence fragments. A. The acute estrogen-stimulated NO release is mediated by an estrogen membrane receptor. B. The acute estrogen-stimulated GnRH release occurs via NO release. *, Significantly different from controls $p < 0.05$. T, tamoxifen; Hb, hemoglobin; L-NAME, NOS inhibitor. From Ref. [30], with permission.

To evaluate whether membrane effects of estrogen are involved in the rapid NO secretion, studies were carried out using $E_2\beta$ covalently bound to bovine serum albumin (E_2 -BSA), an impermeable cell membrane estradiol analog [30]. E_2 -BSA was efficient in stimulating NO release from median eminence fragment with a kinetic (Fig. 2A) and a dose-response comparable to the one obtained for $E_2\beta$ [30]. These findings suggest that the acute stimulatory effect of estradiol on NO secretion from median eminence fragments is mediated by the activation of a membrane estrogen receptor.

Studies were performed to confirm that estrogen receptors are involved in the rapid estrogen-mediated increase in NOS activity at the median eminence [30]. The estrogen receptor antagonist tamoxifen succeeded in inhibiting at 10^{-8} M both the $E_2\beta$ - and the E_2 -BSA-stimulated NO release (Fig. 2). Tamoxifen is an estrogen receptor antagonist that interacts with the estrogen receptor hormone-binding domain [31] supporting the conclusion that the hormone-binding domain of estrogen receptors is required for the acute activation of NOS by $E_2\beta$ and suggesting that the membrane estrogen receptor is very similar to the classical nuclear receptor. Supporting this last position, the expression of cDNAs for either estrogen receptor α or estrogen receptor β , that are the two known nuclear estrogen receptors, has been shown to result in the production of a single transcript that gives rise to both membrane and nuclear proteins [32].

There is also evidence that the acute stimulation of NO secretion by estradiol results in a rapid GnRH release from the GnRH neuroendocrine terminals of the external zone of the median eminence [30]. A 10-min exposure of median eminence fragments to nanomolar concentrations of either $E_2\beta$ or E_2 -BSA results in a significant increase in GnRH levels in the incubation medium (Fig. 2B). The

diol-stimulated GnRH release is agonized with both hemoglobin (a NO scavenger) and NOS inhibitors, demonstrating that the stimulatory effect of estradiol on GnRH releasing activity occurs via NO secretion (Fig. 2B). In addition, the NO-inhibitive guanylyl cyclase inhibitor ODC [33] inhibited the E₂-stimulated GnRH release [30], indicating that the induction of GnRH release subsequent to the E₂-stimulated NO secretion was mediated by the activation of the soluble guanylyl cyclase in the GnRH nerve terminals. The soluble guanylyl cyclase is the main known target for NO in the central nervous system [34]. These findings indicate that physiologic concentrations of estrogen acutely activate GnRH release by activating NO secretion in the median eminence of the hypothalamus.

Long-term estrogen-stimulated NO release. As stated earlier NO/GnRH releasing activity from median eminence fragments is highest on proestrus (Fig. 1) [19]. At this time of the estrous cycle the estrogen levels are also the highest [35]. To assess whether estrogen is involved in the marked increase of NO/GnRH secretory activity within the median eminence between the afternoon of diestrus II and the morning of proestrus, studies were carried out in ovariectomized rats supplemented or not with gonadal steroids (Fig. 3). NO/GnRH releasing activity recorded in median eminence fragments obtained from 2-weeks ovariectomized female rats is comparable to the one recorded on diestrus II. Treatment of ovariectomized females with estradiol-benzoate for 48 h results in a dramatic increase in both NOS activity and GnRH release at the median eminence (Fig. 2). These results strongly indicate that the dramatic changes in NO/GnRH releasing activity monitored on the morning of proestrus are due to the increase of estrogen levels

between the evening of diestrus II and morning of proestrus [35]. The findings further suggest that estrogen may exert part of its stimulatory effects on GnRH secretion necessary to initiate the preovulatory LH surge [36], by stimulating directly the NOS activity at the median eminence.

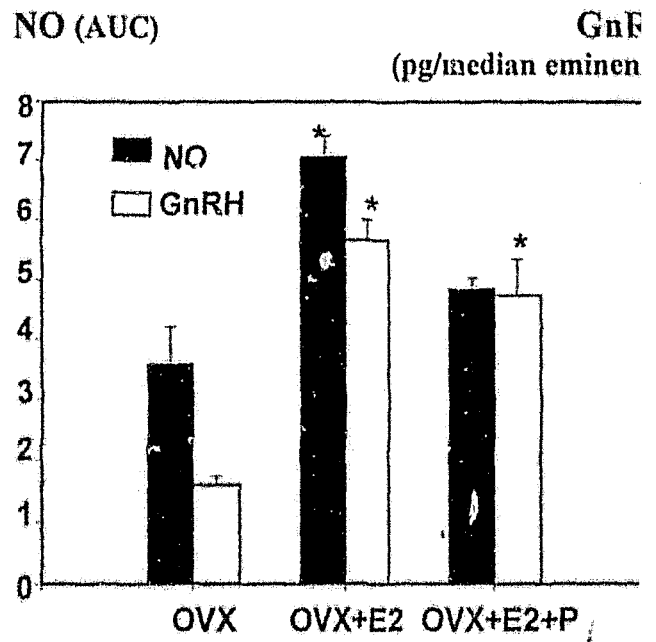


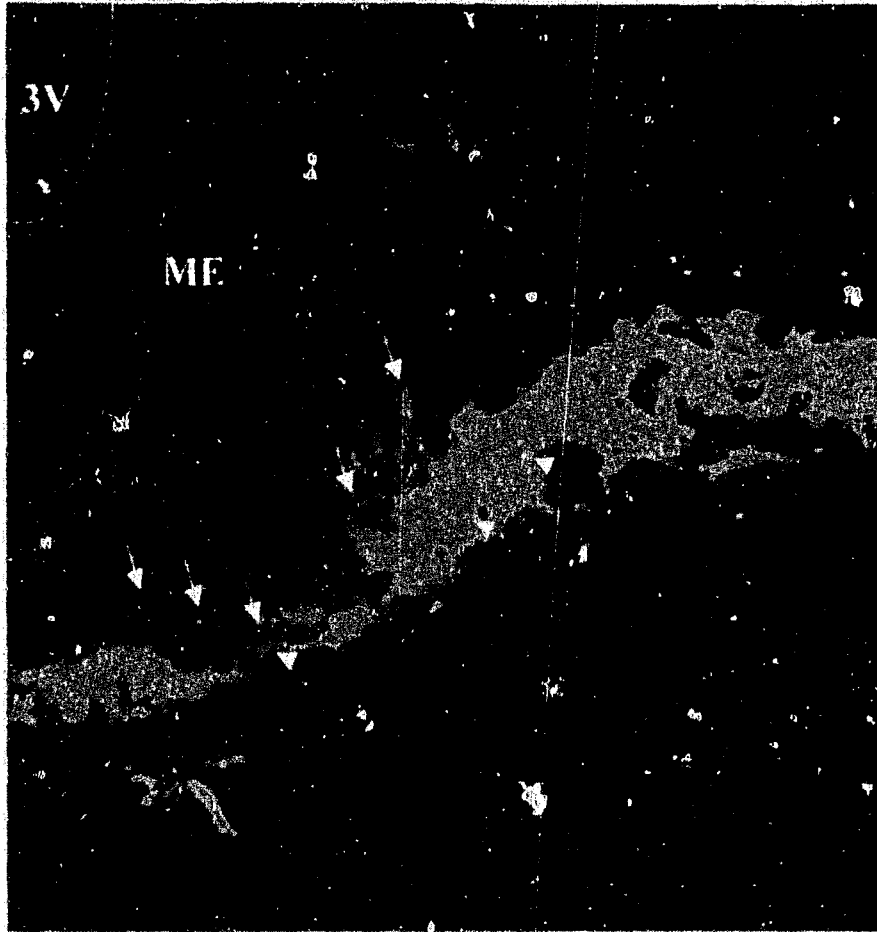
Fig. 3. Effect of gonadal steroids on NO/GnRH release from female median eminence fragments 2 weeks after ovariectomy (OVX). AUC, area under the curve; progesterone. *, Significantly different from OVX, $P < 0.05$. From Ref. [19], with permission.

THE MAJOR SOURCE OF NITRIC OXIDE IN THE MEDIAN EMINENCE IS ENDOTHELIAL IN ORIGIN

Further studies were performed at the median eminence to directly determine the potential source of NO involved in the control of GnRH release into the portal blood vessels [1,19,30]. Immunocytochemical studies using antibodies recognizing constitutive NOS isoforms [5] show the presence within the median eminence of NOS-immunoreactive cells both in the internal layer and at the level of the portal blood capillaries [37,38]. The u

Specific antibodies revealed that the NOS isoform present in the internal zone of the median eminence was nNOS [12] while the other isoform located in the portal blood vessels was eNOS [1]. Noticeably, at the median eminence the nNOS-

immunoreactivity, located in axonal fibers of neurons projecting to the neuropituitary, and the GnRH-immunoreactivity are distributed separately [12], while eNOS-immunoreactivity is present in the



4. Photomicrograph showing GnRH axonal fibers in the external zone of the median eminence (green, arrows) in apposition to the eNOS-immunoreactive portal blood vasculature (red, arrowheads). 3V, third ventricle; ME, median eminence. From Ref. [1], with permission.

endothelium of the pituitary portal blood capillaries is at immediate proximity to the GnRH-immunoreactive nerve terminals in the external zone of the median eminence (Fig. 4)

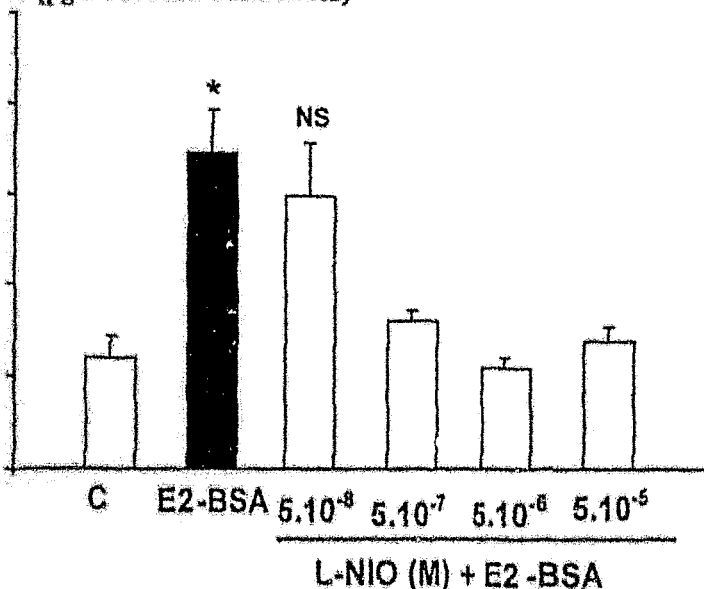
These morphological studies suggest a likely involvement of endothelial NO in the control of GnRH release from GnRH neuroendocrine terminals, than of neuronal NO. This hypothesis is consistent with the inhibition of the gonadal steroids-induced GnRH/LH surge in ovariectomized animals by intracerebroventricular injection of antisense oligonucleotides to eNOS [13].

To confirm the implication of endothelial NO in the control of GnRH release pharmacological studies were undertaken to selectively inhibit eNOS activity, and the repercussions on GnRH release were assessed [19,30]. L-NIO, a well-known inhibitor of NO [39] that shows a better inhibition of eNOS ($IC_{50} = 5.10^{-7}$ M) than nNOS ($IC_{50} = 39.10^{-7}$ M) [39,40], was used (Fig.5). At 5.10^{-7} M, concentration selectively inhibiting eNOS, L-NIO succeeded in inhibiting both the acute $E_2\beta$ -induced GnRH release in male median eminence fragments (Fig. 5A) and the strong

ntaneous NO/GnRH secretion monitored he afternoon of proestrus in female median inence fragments (Fig. 5B). These results onstrate that both the spontaneous release NO recorded across the estrous cycle and $E_2\beta$ -stimulated NO release from median

eminence fragments that participate in the modulation of GnRH release is mainly endothelial in origin.

I (pg/3 median eminences)



NO (AUC)

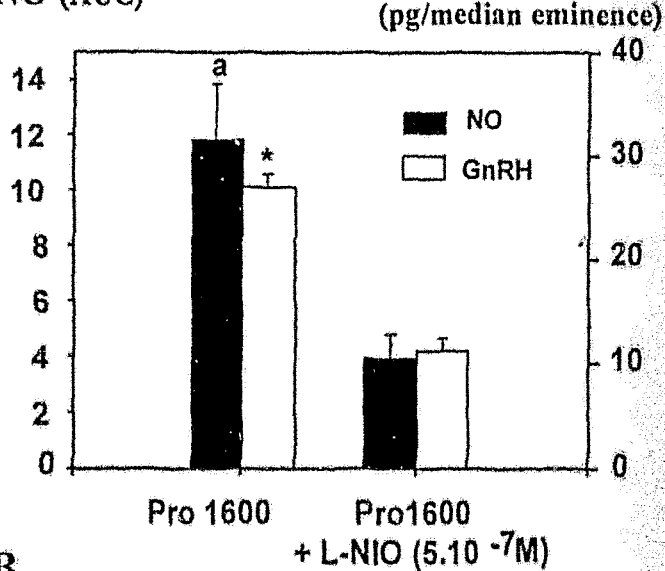


Fig. 5. Inhibition of both acute (A) and long-term (B) effect of estrogen on NO/GnRH release from median eminence fragments by L-NIO, a NOS inhibitor selective for eNOS at 5.10^{-7} M. *, a, Significantly different from the column without asterisk or letter, $p < 0.05$. NS, non significant difference; C, control; Pro, proestrus. From Ref. [19] and Ref. [20], with permission.

IGNAL TRANSDUCTION INVOLVED IN NOS ACTIVATION AT THE MEDIAN MINENCE

Rapid activation of eNOS activity by estrogen. The likely implication of estrogen membrane receptor in the rapid estrogen-stimulated NO release from median eminence fragments discussed above is strengthened by the study of Langub and Watson [41] showing that at the median eminence endothelial cells express estrogen receptors. Median eminence endothelial cells could indeed express part of their estrogen receptors at the cell surface as suggested by the work of Razandi and co-workers [32] on CHO cells. Further studies were performed in human arterial endothelial

cells (HAEC) *in vitro* to begin to dissect the signal transduction involved in rapid eNOS activation subsequent to estrogen stimulation [42]. HAEC respond to nanomolar concentrations of $E_2\beta$ and E_2 -BSA by a release of NO within seconds after the addition of the drugs into the culture medium. The NOS inhibitor-sensitive estradiol-stimulated NO release is preceded by an increase in intracellular calcium concentrations that occurs within 6 seconds after the addition of the substance. Both the rise in cytoplasmic concentrations of calcium and NO secretion are blocked by flunaroxifen [42]. When intracellular calcium stores were depleted $E_2\beta$ -stimulated NOS activity is fully inhibited. These findings indicated that the rapid effect of estrogen on

ntaneous NO/GnRH secretion monitored the afternoon of proestrus in female median eminence fragments (Fig. 5B). These results demonstrate that both the spontaneous release of NO recorded across the estrous cycle and E₂β-stimulated NO release from median

eminence fragments that participate in the modulation of GnRH release is mainly endothelial in origin.

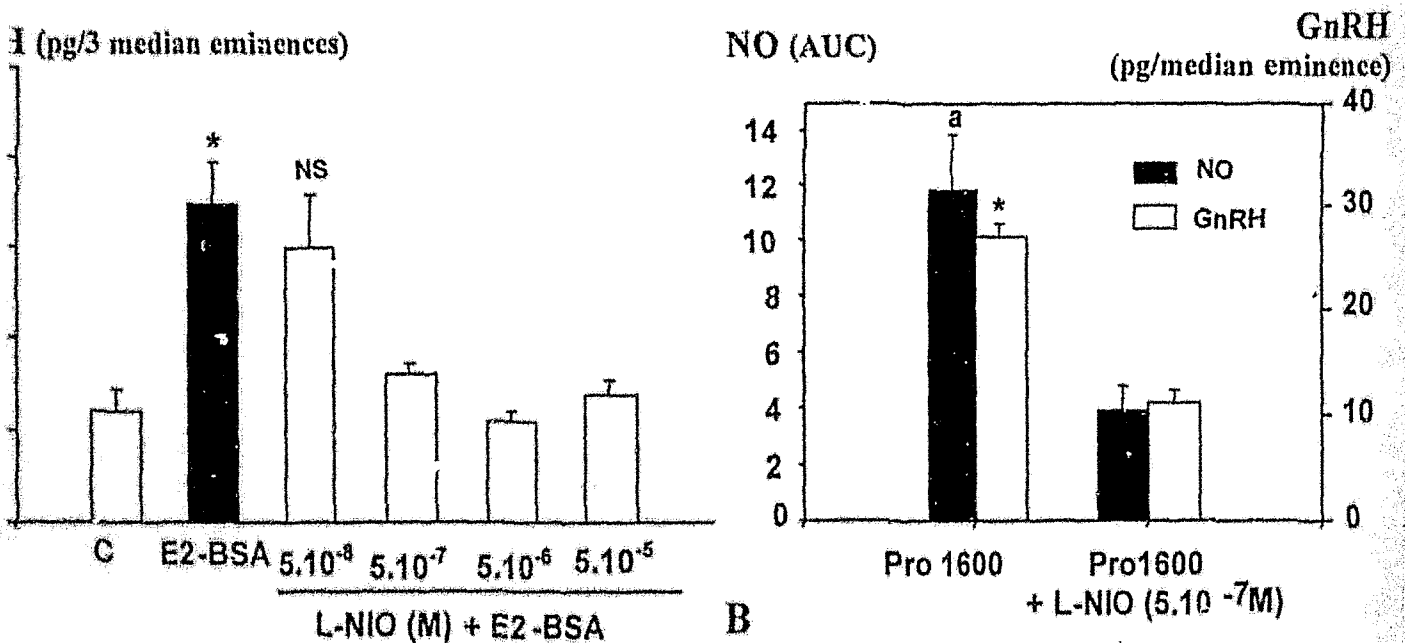


Fig. 5. Inhibition of both acute (A) and long-term (B) effect of estrogen on NO/GnRH release from median eminence fragments by L-NIO, a NOS inhibitor selective for eNOS at 5.10⁻⁷ M. *, a, Significantly different from the column without asterisk or letter, p < 0.05. NS, non significant difference; C, control; Pro, proestrus. From Ref. [19] and Ref. [20], with permission.

SIGNAL TRANSDUCTION INVOLVED IN eNOS ACTIVATION AT THE MEDIAN EMINENCE

Rapid activation of eNOS activity by estrogen. The likely implication of estrogen membrane receptor in the rapid estrogen-stimulated NO release from median eminence fragments discussed above is strengthened by the study of Langub and Watson [41] showing that at the median eminence endothelial cells express estrogen receptors. Median eminence endothelial cells could indeed express part of their estrogen receptors at the cell surface as suggested by the work of Razandi and co-workers [32] on CHO cells. Further studies were performed in human arterial endothelial

cells (HAEC) *in vitro* to begin to dissect the signal transduction involved in rapid eNOS activation subsequent to estrogen stimulation [42]. HAEC respond to nanomolar concentrations of E₂β and E₂-BSA by a release of NO within seconds after the addition of the drugs into the culture medium. The NOS inhibitor-sensitive estradiol-stimulated NO release is preceded by an increase in intracellular calcium concentrations that occurs within 6 seconds after the addition of the substance. Both the rise in cytoplasmic concentrations of calcium and NO secretion are blocked by tamoxifen [42]. When intracellular calcium stores were depleted E₂β-stimulated NOS activity is fully inhibited. These findings indicated that the rapid effect of estrogen on

OS in endothelial cells is dependent of the use of calcium from intracellular stores in the cytoplasm. Interestingly, reverse transcription experiments revealed that this particular type of endothelial cells (HAEC) express the mRNA for the estrogen receptor β but not the one coding for the estrogen receptor α [42]. This result suggests that the rapid activation of eNOS activity by estrogen may occur in HAEC through the activation of estrogen receptor β . The hypothesis of the application of a "classical" estrogen receptor for the mediation of the rapid effects of estradiol on endothelial NO release is supported by the work of Chen and coworkers [43] demonstrating that COS-7 cells co-transfected with both eNOS and estrogen receptor α cDNAs respond to estrogen by an acute activation of eNOS activity, while the cells only transfected with eNOS cDNA do not show any response. Moreover, the intracellular location of the estrogen receptors mediating the acute estrogen-stimulated NO release in endothelial cells has been confirmed by others [44-47].

Modulation of eNOS activity across the estrous cycle. The variations of the amplitude of NO secretions from median eminence fragments across the estrous cycle (fig. 1) may be due to either an increase of eNOS expression and/or an increase in eNOS activity within the endothelial cells of the median eminence. Unpublished results (Knauf *et al.*, 2001) suggest that both eNOS mRNA and protein are differentially expressed in the median eminence during the rat estrous cycle with a peak expression on proestrus. Experiments undertaken in ovariectomized and steroid-primed animals suggest that the increase of both mRNA and protein levels of eNOS between the afternoon of diestrus II and the morning of proestrus are linked to the increase in $E_2\beta$ plasmatic levels. These data confirm that estrogen has beside a rapid intracellular stimulatory effect on eNOS

activity [30], a genomic effect on eNOS expression [19]. The presence of an estrogen receptor-binding element on eNOS promoter suggests that estrogen may directly regulate eNOS gene transcription [48]. The same unpublished study (Knauf *et al.*, 2001) suggests that estrogen may not only modulate median eminence eNOS expression across the estrous cycle but also its activity. Estrogen is indeed shown to downregulate the expression of caveolin-1, a specific endogenous inhibitor of eNOS [49-51] on the afternoon of proestrus, stage of the estrous cycle where NO releasing activity is maximal at the median eminence (Fig. 1) [19]. These results show that at the median eminence in addition to its acute non-genomic effect on endothelial NO release [30], estrogen modulates both eNOS levels and activity during the estrous cycle through the regulation of eNOS and caveolin-1 expression.

Putative cellular mechanisms underlying pulsatile endothelial NO release. The molecular mechanism underlying pulsatile NO release from median eminence endothelial cells remains to be elucidated. However, recent findings suggest that various stimuli may cause post-transcriptional modifications of eNOS, which modulate both the localization and the activity of the enzyme, and/or periodic rises in intracellular calcium concentrations that stimulate eNOS activity in endothelial cells. For example, myristoylation and palmitoylation are post-transcriptional modifications that target eNOS to compartments of the cell membrane formed by invaginations in the membrane named the plasmalemma caveoli [52-55] that function to bind and organize a variety of signal proteins [56], such as membrane receptors, and among them, the estrogen receptors [43]. Within the caveolae, eNOS is associated with caveolin-1, a resident scaffolding protein that selectively inhibits NO synthesis by antagonizing calmodulin activation of eNOS [50]. The inhibition of eNOS by caveolin-1 is reverted by

ases in calcium/calmodulin concentrations that activates eNOS activity renders eNOS more sensitive to palmitoylation [57] and leads to eNOS translocation to more soluble intracellular sites where the activity of the enzyme is further enhanced by phosphorylation [58] that increases the efficiency of its activation by calcium/calmodulin [59]. After the decline in intracellular calcium to basal levels, caveolin-1 may once again interact with eNOS, leading to enzyme inhibition. Then, re-palmitoylation of eNOS facilitates rapid and efficient translocation of the inactivated enzyme within the caveolar compartment [60,61]. Such a cycle of activation for eNOS in response to varied stimuli, such as estrogen [62], factors stimulating G-protein-coupled receptors [63], and growth factors [64] could account for pulsatile NO release at the median eminence. Interestingly, the median eminence endothelial cells express the neuropeptide Y (NPY) Y1 G-protein-coupled receptor [65] that is known to activate NO pathway in endothelial cells [66]. NPY, a key modulator of GnRH release [67,68] could thus be one of the factors secreted at the median eminence that regulates pulsatile endothelial NO release. Glutamate, another key modulator of GnRH release [69,70], could also be involved in the control of median eminence endothelial NO release through the activation of NMDA receptors [71] that may be expressed in cerebral endothelial cells [72] via the modulation of intracellular calcium concentrations [73].

SUMMARY AND CONCLUSION

At the median eminence NO appears to be an important neuromodulator that controls GnRH release into the pituitary portal blood vessels. Studies in median eminence fragments from female rats demonstrate that this gaseous signaling molecule is secreted spontaneously from the endothelium of the

vascular wall located at the immediate proximity of the GnRH neuroendocrine terminals in the external zone of the median eminence. This endothelial NO secretion during the estrous cycle is both pulsatile and cyclic. The fact that the increase in median eminence NO pulse amplitude on the day of proestrus is correlated to an increase in basal GnRH release and is concomitant with the increase in GnRH pulse amplitude observed *in vivo* [74] strongly suggest that these events are tightly linked. Estrogen appears to play a key role in the modulation of this cyclic spontaneous endothelial NO release at the median eminence. Estrogen exerts a stimulatory effect on NO/GnRH release at the median eminence through both an acute and a long-term effect. The acute non-genomic action of estrogen is mediated via the activation of endothelial membranous estrogen receptors that subsequently stimulate eNOS activity. The long-term action of estrogen on NO/GnRH release appears to be mediated, at least in part, by the stimulation of eNOS expression at the transcriptional level and the down-regulation of caveolin-1 protein expression that is an endogenous inhibitor of eNOS activity. These findings demonstrate that the spontaneous NO release at the median eminence, which may modulate both pulsatile and cyclic GnRH release, provides a unique regulatory mechanism for the GnRH neuroendocrine axis by which it could control primary events such as puberty, gametogenesis and ovulation.

Along with the implications regarding NO and GnRH neuroendocrine function, the present findings are important because they reveal the involvement in the central control of reproduction of cell-to-cell communication processes other than the neuron-to-neuron or glial-to-neuron interactions [75,76], i.e., endothelial cells in the control of median eminence neurosecretions.

KNOWLEDGMENTS

This research was supported by INSERM (22), the University of Lille II. Claude auf was a graduate student supported by a nt from the Centre Hospitalier et iversitaire de Lille and the Region Nord- Calais, France. The studies were in part, ported by NIH DA 09010 and MH 47392 3S).

REFERENCES

- Prevot, V., Bouret, S., Stefano, G.B., and Beauvillain, J.C. 2000, *Brain Res. Brain Res. v.*, 34, 27.
- Settori, V., Gimeno, M., Lyson, K., and Cann, S.M. 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. A.*, 89, 11543.
- Moretto M, Lopez FJ, and Negro-Vilar A. 1993, *Endocrinology*, 133, 2399.
- Bonavera, J.J., Sahu, A., Kalra, P.S., and Kalra, S.P. 1993, *Endocrinology*, 133, 2481.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M., and Snyder, S.H. 1990, *Nature*, 347, 768.
- Bredt, D.S., Glatt, C.E., Hwang, P.M., Stuhi, M., Dawson, T.M., and Snyder S.H. 1991, *Neuron*, 7, 615.
- Lopez, F.J., Moretto, M., Merchenthaler, I., and Negro-Vilar, A. 1997, *J. Neuroendocrinol.*, 9, 647.
- Belsham, D.D., Wetsel, W.C., and Mellon, L. 1996, *EMBO J.*, 15, 538.
- Forstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., Sakane, M., Schwarz, P., Gath, I., and Kleinert, H. 1994, *Hypertension*, 23, 1121.
- Knowles, R.G., and Moncada, S. 1994, *Biochem. J.*, 298, 249.
- Grossman, A.B., Rossmanith, W.G., Habigting, E.B., Cadd, G., Clifton, D., and Weiner, R.A. 1994, *J. Endocrinol.*, 140, R5.
- Herbison, A.E., Simonian, S.X., Norris, P.J., and Emson, P.C. 1996, *J. Neuroendocrinol.*, 8, 3.
13. Aguan, K., Mahesh, V.B., Ping, L., Bhat, G., and Brann, D.W., 1996, *Neuroendocrinology*, 64, 449.
14. Kohsaka, H., Watanobe, Y., Kakizaki, T., and Suda, A. 1999, *Neuroendocrinology*, 69, 245.
15. Pu, S., Kalra, P.S., and Kalra, S.P. 1998, *J. Neuroendocrinol.*, 10, 617.
16. Pu, S., Xu, B., Kalra, S.P., and Kalra, P.S. 1996, *Endocrinology*, 137, 1949.
17. Pu, S., Horvath, T.L., Diano, S., Naftolin, F., Kalra, P.S., and Kalra, S.P. 1997, *Endocrinology*, 138, 1537.
18. Bouret, S., Prevot, V., Croix, D., Viltart, O., Stefano, G.B., Mitchell, V., and Beauvillain, J.C. 2000, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 80, 46.
19. Knaut, C., Prevot, V., Stefano, G.B., Mortreux, G., Beauvillain, J.C., Croix, D. 2001, *Endocrinology*, 142, 2343.
20. Bourguignon, J.P., and Franchimont, P. 1981, *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, 175, 389.
21. Bourguignon, J.P., and Franchimont, P. 1984, *Endocrinology*, 114, 1941.
22. Rasmussen, D.D. 1993, *Neuroendocrinology*, 58, 511.
23. Sisk, C.L., Richardson, H.N., Chappell, P.E., and Levine, J.E. 2001, *Endocrinology*, 142, 2929.
24. Bourguignon, J.P., Gerard, A., Alvarez Gonzalez, M.L., and Franchimont, P. 1993, *Hum. Reprod.*, 8, Suppl 2, 18.
25. Brown, T.J., Clark, A.S., and MacLusky, N.J. 1987, *J. Neurosci.*, 7 2529.
26. Brown, T.J., MacLusky, N.J., Shanabrough, M., and Naftolin, F. 1990, *Endocrinology*, 126, 2965.
27. Simerly, R.B., Chang, C., Muramatsu, M., and Swanson, L.W. 1990, *J. Comp. Neurol.*, 294, 76.
28. Shughrue PJ, Bushnell CD, and Dorsa DM., 1992, *Endocrinology*, 131, 381.
29. Couse, J.F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J.A., and Korach, K.S. 1997, *Endocrinology*, 138, 4613.

- Prevot, V., Croix, D., Rialas, C.M., Poulain, Fricchione, G.L., Stefano, G.B., and auvillain, J.C. 1999, *Endocrinology*, 1999, 141, 652.
- Mendelsohn, M.E., and Karas, R.H. 1994, *Am. J. Hypertens. Opin. Cardiol.*, 9, 619.
- Razandi, M., Pedram, A., Greene, G.L., and Joffe, E.R. 1999, *Mol. Endocrinol.*, 13, 307.
- Jarhwaite, J., Southam, E., Boulton, C.L., Jensen, E.B., Schmidt, K., and Mayer, B. 1995, *Mol. Pharmacol.*, 48, 184.
- Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M., and Moncada, S. 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86, 5159.
- Smith, M.S., Freeman, M.E., and Neill, J.D. 1995, *Endocrinology*, 96, 219.
- Herbison, A.E. 1998, *Endocr. Rev.*, 19, 302.
- Deccatelli, S., Lundberg, J.M., Fahrenkrug, J., Brecht, D.S., Snyder, S.H., and Hokfelt, T. 1992, *Neuroscience*, 51, 769.
- Yamada, K., Emson, P., and Hokfelt, T. 1996, *J. Chem. Neuroanat.*, 10, 295.
- Rees, D.D., Palmer, R.M., Schulz, R., and Moncada, S. 1990, *Br. J. Pharmacol.*, 101, 746.
- Moore, W.M., Webber, R.K., Jerome, G.M., Cheng, F.S., Misko, T.P., and Currie, M.G. 1994, *J. Med. Chem.*, 37, 3886.
- Langub, M.C. Jr., and Watson, R.E. Jr. 1992, *Endocrinology*, 130, 364.
- Stefano, G.B., Prevot, V., Beauvillain, J.C., Badier, P., Fimiani, C., Welters, I., Fricchione, G.L., Breton, C., Lassalle, P., Salzet, M., and Blumberg, P.M. 2000, *Circulation*, 101, 1594.
- Chen, Z., Yuhanna, I.S., Galcheva-Gargova, G., Karas, R.H., Mendelsohn, M.E., and Shaul, P.W. 1999, *J. Clin. Invest.*, 103, 401.
- Chambliss, K.L., Yuhanna, I.S., Mineo, C., Libby, P., German, Z., Sherman, T.S., Mendelsohn, M.E., Anderson, R.G., and Shaul, P.W. 2000, *Circ. Res.*, 87, E44.
- Haynes, M.P., Sinha, D., Russell, K.S., Bollinger, M., Fulton, D., Morales-Ruiz, M., Sessa, W.C., and Bender, J.R. 2000, *Circ. Res.*, 87, 677.
46. Russell, K.S., Haynes, M.P., Sinha, D., Clerisme, E., and Bender, J.R. 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97, 5930.
47. Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D.P., Ley, K., Chin, W.W., and Liao, J.K. 2000, *Nature*, 407, 538.
48. Miyahara, K., Kawamoto, T., Sase, K., Yui, Y., Toda, K., Yang, L.X., Hattori, R., Aoyama, T., Yamamoto, Y., Doi, Y., et al. 1994, *Eur. J. Biochem.*, 223, 719.
49. Michel, J.B., Feron, O., Sacks, D., and Michel, T. 1997, *J. Biol. Chem.*, 272, 15583.
50. Ghosh, S., Gachhui, R., Crooks, C., Wu, C., Lisanti, M.P., and Stuehr, D.J. 1998, *J. Biol. Chem.* 273, 22267.
51. Feron, O., Dessy, C., Desager, J.P., and Balligand, J.L. 2001, *Circulation*, 103, 113.
52. Feron, O., Belhassen, L., Kobzik, L., Smith, T.W., Kelly, R.A., and Michel, T. 1996, *J. Biol. Chem.* 271, 22810.
53. Liu, J., Hughes, T.E., and Sessa, W.C. 1997, *J. Cell Biol.*, 137, 1525.
54. Shaul, P.W., Smart, E.J., Robinson, L.J., German, Z., Yuhanna, I.S., Ying, Y., Anderson, R.G., and Michel, T. 1996, *J. Biol. Chem.*, 271, 6518.
55. Garcia-Cardena, G., Martasek, P., Masters, B.S., Skidd, P.M., Couet, J., Li, S., Lisanti, M.P., and Sessa, W.C. 1997, *J. Biol. Chem.*, 272, 25437.
56. Lisanti, M.P., Scherer, P.E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y.H., Cook, R.F., and Sargiacomo, M., 1994, *J. Cell Biol.*, 126, 111.
57. Yeh DC, Duncan JA, Yamashita S, and Michel T. 1999, *J. Biol. Chem.*, 274, 33148.
58. Robinson LJ, Busconi L, and Michel T. 1995, *J. Biol. Chem.*, 270, 995.
59. McCabe, T.J., Fulton, D., Roman, L.J., Sessa, W.C. 2000, *J. Biol. Chem.*, 275, 6123.
60. Feron, O., Saldana, F., Michel, J.B., and Michel, T. 1998, *J. Biol. Chem.*, 273, 3125.
61. Feron, O., Michel, J.B., Sase, K., and Michel, T. 1998, *Biochemistry*, 37, 193.

oetz, R.M., Thatte, H.S., Prabhakar, P.,
s, M.R., Michel, T., and Golan, D.E. 1999,
c. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96, 2788.

farrero, M.B., Venema, V.J., Ju, H., He,
Liang, H., Caldwell, R.B., and Venema,
J. 1999, *Biochem. J.*, 343, 335.

apapetropoulos, A., Garcia-Cardena, G.,
dri, J.A., and Sessa, W.C. 1997, *J. Clin.
est.*, 100, 3131.

i, C., Chen, P., and Smith, M.S. 1999,
ocrinology, 140, 5382.

Jilsson, T., Lind, H., Brunkvall, J., and
vinsson, L. 2000, *Can. J. Physiol.
armacol.*, 78, 251.

evine, J.E., Chappell, P., Besecke, L.M.,
uer-Dantoin, A.C., Wolfe, A.M., Porkka-
iskanen, T., and Urban, J.H. 1995, *Cell
l. Neurobiol.* 15, 117.

erasawa, E. 2001, *Vitam. Horm.* 63, 91.

ourguignon, J.P., Gerard, A., and
anchimont, P. 1989, *Neuroendocrinology*,
402.

Bhat, G.K., Mahesh, V.B., Ping, L.,
iorich, L., Wiedmeier, V.T., and Brann,
W. 1998, *Endocrinology*, 139, 955.

Rossetti, Z.L., Mameli, M., Vargiu, R.,
dda, F., and Mancinelli, R. 2000, *Br. J.
armacol.*, 129, 156.

Krizbai, I.A., Deli, M.A., Pestenacz, A.,
klos, L., Szabo, C.A., Andras, I., and Joo, F.
998, *J. Neurosci. Res.*, 54, 814.

MacDermott, A.B., Mayer, M.L.,
estbrook, G.L., Smith, S.J., and Barker, J.L.
986, *Nature*, 321, 519.

Sarkar, D.K., and Minami, S. 1995, *Biol.
eprod.*, 53, 38.

Ojeda, S.R., Ma, Y.J., Lee, B.J., and Prevot,
2000, *Recent Prog. Horm. Res.*, 55, 197.

Ojeda, S.R., Prevot, V., and Heger S. 2001,
*urrent Opinion in Endocrinology and
abetes*, 8, 154.

DISCUSSION

DISCUSSION

Ce travail de thèse nous permet d'envisager l'implication d'éléments complètement nouveaux dans les mécanismes de contrôle de la libération pulsatile de la GnRH. Tout d'abord, il semble que la libération pulsatile de la GnRH soit intimement liée à une sécrétion également pulsatile de NO. Ensuite, il semble que le NO impliqué soit synthétisé essentiellement par les cellules endothéliales de l'EM, qui doivent alors être considérées comme des partenaires non négligeables dans la régulation de la sécrétion de la GnRH. Enfin, certains neuropeptides, présents dans l'EM, peuvent moduler cette libération spontanée de NO d'origine endothéliale, et influencer la libération de la GnRH via cette voie.

1 / Implication du NO dans la pulsativité de la GnRH

Grâce à l'utilisation d'une technique de mesures ampérométriques, nous avons pu étudier, *ex vivo*, le mode de sécrétion du NO au niveau de l'EM. Cette technique ampérométrique est la seule qui permette la détection directe du NO, en temps réel, sans passer par des molécules intermédiaires. Cette méthodologie, déjà utilisée au laboratoire (Prevot *et al.*, 1998b, 1999b) a permis de montrer l'effet de substances exogènes, telles que la morphine et le 17 β -œstradiol, sur la libération ponctuelle de NO / GnRH dans l'EM de rat mâle. Il nous est alors paru intéressant de savoir si des fragments d'EM de rates cyclées libéraient du NO spontanément, sans ajout de substances exogènes, et donc dans des conditions plus proches de la physiologie.

Ainsi, dans notre premier travail, nous démontrons : 1) que la sécrétion de NO au niveau de l'EM de rate est spontanée, pulsatile et aussi cyclique : en effet, le jour du proœstrus, la libération de NO augmente de façon significative, avec un maximum à 1600h ;

et 2) que la sécrétion de NO est positivement corrélée à celle de la GnRH : de fortes libérations de NO sont associées à des concentrations importantes de GnRH dans le milieu de survie.

Les résultats permettent d'envisager un rôle crucial du NO dans l'activité du système à GnRH. Ainsi, le NO pourrait intervenir dans l'activité pulsatile des neurones à GnRH au niveau de leurs corps cellulaires situés dans l'APO, mais également au niveau des terminaisons nerveuses dans l'EM. L'ensemble de ces actions pourrait favoriser la synchronisation des neurones à GnRH et permettre l'obtention d'un pic préovulatoire de GnRH.

La sécrétion de la GnRH au niveau de l'EM résulte de la rythmicité propre des cellules à GnRH et de leur synchronisation avec les cellules à GnRH voisines. La participation des neurones à GnRH dans ces deux phénomènes reste véritablement à découvrir. Cependant, différents arguments obtenus sur les cellules immortalisées GT1, mais aussi sur des explants de placodes olfactives, laissent supposer que les cellules à GnRH pourraient être le générateur des pulses. Les cellules GT1 ont des potentiels d'action spontanés dépendants du Ca^{2+} extracellulaire (Van Goor *et al.*, 2000). De même, dans les placodes olfactives embryonnaires, les cellules à GnRH possèdent un mécanisme endogène permettant de synchroniser les oscillations de Ca^{2+} cytosolique (Terasawa *et al.*, 1999b). Actuellement, on ne sait pas véritablement s'il existe une relation entre ces oscillations et la libération spontanée de GnRH par ces cellules (Terasawa *et al.*, 1999a).

Il paraît cependant très probable que la composante importante du générateur de pulses soit les cellules à GnRH elles-mêmes. Cependant, la synchronisation de ces pulses demeure une question irrésolue. Certains auteurs ont émis l'hypothèse d'interrelations entre les cellules à GnRH via des jonctions communicantes. Certains arguments sont en faveur de cette

hypothèse : 1) les cellules GT1 sont capables de synthétiser la connexine-26 (Matesic *et al.*, 1993), 2) chez la rate, Hosny et Jenness (1998) ont observé la présence de connexine-32 dans les corps cellulaires et les terminaisons à GnRH. Cependant, même si Suter *et al.* (2000) ont montré l'existence de rares appositions entre quelques neurones à GnRH dans l'APO de souris, il n'a jamais pu être démontré l'existence de jonctions communicantes entre les cellules à GnRH. Par conséquent, l'hypothèse du rôle du NO comme synchroniseur de la libération de la GnRH émise par plusieurs auteurs (Wetsel, 1995 ; Prevot V *et al.*, 2000b ; Terasawa, 2001), paraît cohérente. Cette synchronisation peut s'exercer au niveau de l'APO, et aussi au niveau de l'EM.

Au niveau de l'APO, il est admis que des neurones exprimant la nNOS et entourant les corps cellulaires des neurones à GnRH (Herbison *et al.*, 1996) pourraient être impliqués dans le contrôle de l'activité des neurones à GnRH. En effet, Pu *et al.* (1998) ont observé, par microdialyse, que la synthèse de GMPc, index d'une activité NO, augmentait l'après-midi du proœstrus au niveau de l'APO médiane. De leur côté, Lamar *et al.* (1999) démontrent que l'expression de la protéine nNOS augmente de façon significative l'après-midi du proœstrus dans l'APO. Le NO semble donc jouer un rôle au niveau de l'APO, rôle qui reste cependant à préciser. Selon Pu *et al.* (1998), la libération de cGMP / NO au niveau de l'APO médiane permettrait de stimuler la libération de NPY, ce qui enclencherait les mécanismes responsables de la survenue du pic préovulatoire de GnRH.

L'existence de récepteurs NMDA (Bhat *et al.*, 1995) et mu (μ) (Bouret *et al.*, 2000) au niveau des neurones NOS-positifs de l'APO laisse supposer que ces neurones sont sous le contrôle 1) du glutamate, stimulateur du système à GnRH, et 2) de la β -endorphine, inhibitrice sur le système à GnRH. Ces deux neurotransmetteurs pourraient donc être impliqués dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH au niveau de leurs corps cellulaires via le NO.

Cependant, il est probable que d'autres neuromodulateurs soient impliqués dans l'activité des cellules contenant la nNOS dans l'APO.

L'utilisation du double marquage en immunohistochimie a permis de démontrer, au niveau de l'APO, que les neurones immunopositifs pour la nNOS peuvent également co-exprimer de nombreux neuropeptides tels que les enképhalines, la cholecystokinine et la substance P (Yamada *et al.*, 1996). Par ailleurs, Caillol *et al.* (2000) ont montré la présence d'astrocytes immunoréactifs pour la eNOS au niveau du noyau suprachiasmatique de rat. L'existence d'astrocytes exprimant la eNOS au niveau de l'APO, autour des corps cellulaires des neurones à GnRH, peut être envisagée. En conséquence, les péricaryons à GnRH pourraient être également sous l'influence du NO synthétisé par l'eNOS. Cette voie NOergique présente dans les cellules astrocytaires pourrait être déclenchée par des récepteurs alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid ou AMPA.

En conclusion, de nombreux arguments sont en faveur d'un rôle du NO dans l'APO. Cependant, *in vivo*, il n'a pas été démontré que ce NO intervenait dans la pulsativité ou même la synchronisation des cellules à GnRH.

Au niveau de l'EM, l'importance du NO dans le contrôle de la libération pulsatile de la GnRH est clairement établie depuis quelques années, aussi bien *in vivo* (Rettori *et al.* 1994a, 1994b), qu'*in vitro* (Lopez *et al.*, 1997). Ainsi, le blocage de l'activité NOS ou l'apport exogène de donneurs de NO ont prouvé indirectement l'importance de ce messager gazeux dans le contrôle des neurosécrétions et de la sécrétion de la LH (Introduction, II, Chapitre 11).

Notre travail est le premier à démontrer l'existence d'une libération spontanée et pulsatile de NO par des fragments d'EM de rates cyclées. Cette sécrétion de NO varie au cours du cycle œstral : elle est positivement corrélée à la libération de la GnRH et est

maximale à 1600h en proœstrus, au moment du pic préovulatoire de GnRH. Par conséquent, il apparaît vraisemblable que cette pulsativité du NO intrinsèque à l'EM soit un élément très important dans la pulsativité de la sécrétion de GnRH.

Au vu des résultats obtenus, nous pouvons supposer que les stéroïdes gonadiques étaient impliqués, au cours du cycle œstral, dans cette libération pulsatile et cyclique de NO par l'EM. C'est la raison pour laquelle nous avons réalisé des mesures ampérométriques de NO, chez des animaux ayant subi une ovariectomie avec ou sans supplémentation en stéroïdes.

La supplémentation en œstradiol chez des rates ovx entraîne une libération massive de NO / GnRH dans l'EM. Nous pouvons alors supposer que la libération importante de NO / GnRH observée dès le matin du proœstrus serait due à l'augmentation massive de la concentration en œstradiol plasmatique (Smith *et al.*, 1975). Par conséquent, l'effet stimulateur de l'œstradiol dans les conditions physiologiques sur la libération de NO dans l'EM pourrait être membranaire, très rapide (quelques minutes) (Prevot *et al.*, 1999b), mais aussi, compte tenu de nos observations, être génomique. Dans d'autres modèles, il a été montré que l'œstradiol stimulait l'expression de l'ARNm et de la protéine eNOS (Weiner *et al.*, 1994 ; McNeill *et al.*, 1999).

Les rates ovx, supplémentées à l'œstradiol et traitées à la progestérone, ne présentent pas une libération de NO significativement plus élevée que les animaux ovx. Dans notre système, la progestérone ne serait pas un des acteurs majeurs impliqués dans le contrôle des interrelations entre le NO et la GnRH provoquant l'induction du pic préovulatoire. Son importance n'est toutefois pas à négliger puisque les antagonistes des récepteurs à la progestérone bloquent le pic de GnRH / LH induit par l'œstradiol chez les rats (Chappell *et al.*, 2000a et b). De plus, les souris KO pour le récepteur à la progestérone ne montrent pas de (11) et de FSH induits par l'œstradiol (Chappell *et al.*, 1999). Dans nos conditions

expérimentales, la supplémentation en œstradiol plus progestérone chez des animaux ovx entraîne un pic de LH correspondant au proœstrus 1800h. Nous pouvons imaginer qu'à ce stade, la progestérone joue un rôle de frein sur la sécrétion de NO, et ceci dans le but de retourner à des niveaux basaux de libération de NO / GnRH : cet événement pourrait marquer le début de la rétroaction négative de la progestérone.

Par ailleurs, nos animaux n'étant pas surrénalectomisés (adx), l'influence des surrénales dans la régulation de la sécrétion de la GnRH ne doit pas être négligée. En effet, celles-ci ont la capacité de sécréter des stéroïdes, et notamment de la progestérone (Brann *et al.*, 1991). Effectivement, après ovariectomie, des taux d'œstradiol et de progestérone plasmatique restent toujours détectables mais en très faible quantité. On ne peut écarter que ces stéroïdes influencent le système à GnRH. D'autres expériences de mesures ampérométriques chez des animaux ovx et adx permettront de déterminer l'influence des surrénales sur la sécrétion de NO / GnRH.

Etant donné que les neurones à GnRH n'expriment pas les NOS *in vivo* (Grossman, 1994 ; Herbison *et al.*, 1996) par opposition aux cellules immortalisées GT1 à GnRH (Lopez *et al.*, 1997 ; Mahachoklertwattana *et al.*, 1994), la source du NO dans l'EM est donc «exogène» aux terminaisons nerveuses à GnRH.

Du fait de son rôle de messager gazeux diffusible, le NO pourrait activer en même temps les voies GC et COX (Introduction, II, *Chapitre 6*) de l'ensemble des terminaisons nerveuses des neurones à GnRH de la zone externe de l'EM, permettre leur synchronisation et l'exocytose des granules contenant la GnRH dans le sang porte. Cette hypothèse de «NO synchroniseur» est renforcée par le fait que la période moyenne des pulses de NO mesurée dans notre étude est de 32 ± 1 min. ($n = 56$), ce qui est très proche de la fréquence de sécrétion de la GnRH (33 ± 8 min.) par des explants d'hypothalamus de rat mâle (Bourguignon *et al.*,

1993). Au cours du cycle œstral, nous constatons qu'aux stades proœstrus 0800h et 1400h, les périodes sont significativement plus faibles (29 ± 1 min et 25 ± 2 min, respectivement), ce qui suggère une activité NO plus rapide à ces moments. De même, en proœstrus 1700h et 1800h, la durée des pics est augmentée (28 ± 1 min et 27 ± 2 min, respectivement). Ainsi, il apparaît que plus la libération de NO est importante (amplitude, aire, fréquence, durée), plus nous observons un accroissement de la libération de la GnRH. Dès lors, puisque la libération de NO au niveau de l'EM est, dans notre étude, corrélée positivement à celle de la GnRH, nous pouvons penser que les sécrétions de NO précèdent celles de la GnRH, et auraient un rôle synchroniseur. Cette hypothèse pourra être vérifiée grâce à l'utilisation d'un système de chambre à périfusion compatible avec nos sondes NO. Ce système va nous permettre de mesurer, en continu, le NO libéré par l'EM, et de doser, dans des périodes plus courtes, la libération de la GnRH.

En conclusion, on peut émettre l'hypothèse que le « pulse generator » initial est la cellule à GnRH, et qu'il existe peut être une synchronisation des cellules via le NO dans l'APO : mais ceci reste cependant à être démontré. Par contre, nos travaux suggèrent fortement qu'il existe un synchroniseur NOergique dans l'EM qui permet de mettre en phase la décharge de la GnRH dans le système porte. Ce synchroniseur serait dépendant de la concentration plasmatique en œstradiol et pourrait être lié à une action génomique de ce stéroïde. Le rôle de la progestérone reste à être démontré.

II / Origine du NO libéré de façon spontanée

Au niveau de l'EM, le NO peut être synthétisé par la nNOS et / ou la eNOS. En effet, des fibres de neurones, immunoréactives pour la nNOS, ont été détectées au niveau de la zone

interne de l'EM (Herbison *et al.*, 1996 ; Yamada *et al.*, 1996). Parallèlement, les cellules endothéliales du système porte hypothalamo-hypophysaire sont immunoréactives pour la eNOS (Prevot *et al.*, 2000b). Certains arguments nous laissent supposer que le NO synthétisé par les cellules endothéliales de l'EM pourrait être impliqué dans le contrôle de la libération pulsatile de la GnRH :

1) des travaux effectués précédemment dans le laboratoire ont montré que la libération de NO par l'EM, sous l'action de substances exogènes comme la morphine ou l'œstradiol (Prevot *et al.*, 1998b, 1999b), pouvait être inhibée par le L-NIO à 5.10^{-7} M. Or, même s'il n'existe pas de véritables inhibiteurs spécifiques des différentes NOS, il est admis qu'aux concentrations utilisées, le L-NIO est plutôt spécifique de la eNOS. Compte tenu des réponses rapides observées, les actions de la morphine et de l'œstradiol passeraient via des récepteurs membranaires localisés au niveau des cellules endothéliales (Prevot *et al.*, 1998b, 1999b).

2) Aguan *et al.* (1996) ont montré que des injections i.c.v. d'oligonucléotides antisens de l'eNOS sont plus efficaces que ceux de la nNOS pour supprimer le pic de LH induit chez des rates ovx et supplémentées en œstradiol et progestérone.

3) le troisième argument est lié à l'observation de dysfonctionnements importants du cycle œstral, de la morphologie ovarienne, de l'ovulation et de la stéroïdogénèse chez les souris knock-out pour la eNOS.

Cependant, l'élément majeur et le plus intéressant concerne l'étude de l'expression de la eNOS dans l'EM au cours du cycle œstral et dans des conditions expérimentales. Nous avons effectivement démontré que les taux d'ARNm et de protéine eNOS dans l'EM augmentent à 0800h et 1600h en proœstrus par rapport au diœstrus II. Ces taux retournent à des niveaux basaux dès 1800h en proœstrus, et jusqu'au diœstrus II. Par ailleurs, l'influence

des stéroïdes, et surtout celle de l'œstradiol, est très nette. Les animaux ovx ont des taux d'ARNm et de protéine eNOS très faibles. La supplémentation en œstradiol chez les rates ovx entraîne une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine eNOS dans l'EM. Par contre, la supplémentation en œstradiol plus progestérone provoque une diminution du taux d'ARNm eNOS mais n'affecte pas les taux de la protéine eNOS.

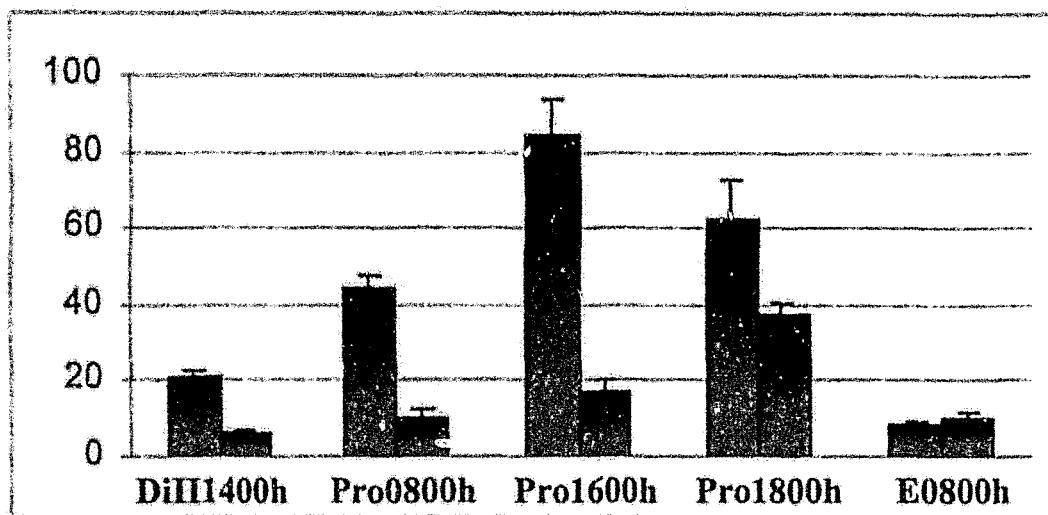
Au vu de ces résultats, nous pouvons supposer que l'augmentation de l'expression de l'eNOS dès le matin du proœstrus serait due à une concentration accrue d'œstradiol circulant, dont l'influence a été montrée précédemment sur la libération de NO / GnRH. Cet œstradiol était déjà connu pour stimuler l'expression de l'ARNm eNOS (Weiner *et al.*, 1994) et de la protéine eNOS (McNeill *et al.*, 1999) dans les cellules endothéliales. Dans notre étude, la progestérone serait inhibitrice sur la transcription de l'ARNm eNOS, mais pas sur la traduction. Actuellement, aucune étude ne s'est intéressée à l'effet de la progestérone sur l'expression de l'eNOS. Des travaux montrent que la progestérone peut provoquer une diminution de l'activité NOS chez les macrophages par son action inhibitrice sur l'ARNm de la iNOS (Salzman *et al.*, 2000). Les taux élevés de protéines observés chez les rates ovx supplémentées en œstradiol et progestérone seraient dus à une synthèse antérieure de protéine eNOS en réponse à l'action stimulatrice de l'œstradiol. Physiologiquement, nous pouvons alors imaginer que la progestérone permettrait un retour à l'état basal de l'expression de l'eNOS dans l'EM dès 1800h en proœstrus et jusqu'au stade diœstrus II. Ceci se répercuterait alors au niveau de la sécrétion de NO qui serait, dès lors, moins importante : le rôle de frein de la progestérone pourrait s'exercer en partie via une diminution de l'expression de l'ARNm de l'eNOS, ce qui aboutirait dans des temps plus longs à une diminution de la quantité de protéine eNOS et à une chute de la synthèse du NO d'origine endothéliale.

Nous remarquons également que les taux de protéines cav-1, localisées dans les cellules endothéliales, ont un profil d'expression inverse de celui de l'eNOS : l'expression de

cav-1 dans l'EM chute de façon significative à 1600h en proœstrus. La fixation de la cav-1 sur l'eNOS bloque son activité : la dissociation du complexe eNOS / cav-1 en réponse à divers stimuli va directement provoquer la translocation de l'eNOS vers des sites intracellulaires où elle sera active (Michel, 1999). Une étude récente de Feron *et al.* (2001) a montré que l'activité de l'eNOS était directement liée à la quantité de cav-1 : la stimulation de cellules endothéliales par l'atorvastatine entraîne une diminution de la quantité de cav-1, ce qui a pour effet de restaurer l'activité NOS basale ou stimulée. Ainsi, nos résultats laissent supposer que les taux élevés de NO mesurés à 1600h en proœstrus, seraient en partie dus à une augmentation de l'expression de l'eNOS, au niveau ARNm et protéine, mais aussi à une diminution du taux de la quantité de protéine inhibitrice cav-1 (FIGURE 12).

Pour étudier l'influence des stéroïdes, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'expression de la protéine cav-1 dans l'EM de rates ovx, ovx supplémentées en œstradiol, ovx supplémentées en œstradiol et progestérone. La supplémentation en stéroïdes (œstradiol ou œstradiol plus progestérone) provoque une diminution significative du taux de cav-1 par opposition aux rates témoins ovx. L'œstradiol pourrait donc avoir un effet inverse sur l'expression de l'eNOS et de la cav-1. La combinaison entre une augmentation du taux d'eNOS et une diminution du taux de cav-1 a déjà été observée aux niveaux d'artérioles par Pellegrino *et al.* (2000), et cet effet de l'œstradiol serait crucial au déclenchement du pic de la GnRH.

En résumé, les variations d'expression de la eNOS au cours du cycle œstral suivent les variations de NO mesurées par ampérométrie : le jour du proœstrus, l'expression de l'eNOS au niveau ARNm et protéine est maximale à 0800h et 1600h. Une forte augmentation de l'expression de l'eNOS associée à une diminution de celle de la cav-1 permettrait d'obtenir une libération massive de NO à 1600h en proœstrus, au



- Concentration en œstradiol plasmatique (pg / ml)
- Concentration en progestérone plasmatique (ng / ml)

	DiIII1400h	Pro0800h	Pro1600h	Pro1800h	E0800h
ARNm eNOS	-	↗	↗	-	-
Protéine eNOS	-	↗	↗	-	-
Protéine cav-1	-	-	↘	-	-

FIGURE 12. Représentation schématique des variations des taux d'ARNm eNOS et des protéines eNOS et cav-1 dans l'EM au cours du cycle œstral, en association avec les taux en œstradiol et progestérone plasmatique (n = 9, par heure et jour).

moment du pic de la GnRH. L'œstradiol, qui régule inversement l'expression de ces deux protéines, semble être un élément majeur du système eNOS / NO / GnRH. Ce travail prouve que l'endothélium est bien impliqué dans le contrôle des neurosécrétions au niveau de l'EM, et est le premier à impliquer la cav-1 au niveau de l'axe reproducteur.

Il existe également d'autres types de régulation impliqués dans le contrôle de l'activité de l'eNOS : des travaux récents s'intéressent aux mécanismes d'activation de l'eNOS sans intervention de Ca^{2+} (Introduction, II, *Chapitre 5, c*). Les kinases de type Akt sont capables de phosphoryler la eNOS sur des résidus Sérine, induisant son activation d'une façon indépendante du Ca^{2+} (Fulton *et al.*, 1999 ; Dimmeler *et al.*, 1999). Ces types de modifications post-traductionnelles devront être étudiés prochainement dans notre modèle ampérométrique : le blocage de la voie Akt nous permettra de voir l'influence de cette kinase dans la libération spontanée de NO d'origine endothéliale.

III / Elément(s) générateur(s) de la sécrétion spontanée de NO au niveau de l'EM

La poursuite logique de notre travail a été de réfléchir sur les mécanismes responsables de cette pulsativité de la libération de NO par l'EM. Deux grandes hypothèses nous paraissaient possibles :

- 1) les cellules endothéliales du plexus porte, comme les cellules à GnRH, peuvent avoir leur pulsativité intrinsèque qui peut être modulée soit par les œstrogènes circulants, et / ou par des neurohormones libérées par la zone externe de l'EM.

2) la pulsativité de la libération de NO est directement liée à l'action de neurohormones, elles-mêmes déversées de façon pulsatile par des terminaisons nerveuses de l'EM, et qui agiraient sur les cellules endothéliales.

Dans les deux cas, cela implique l'existence de récepteurs aux neurohormones dans l'EM, et dans le deuxième cas, cela suggère que les neurohormones doivent être libérées de façon pulsatile.

L'hypothèse d'une pulsativité intrinsèque des cellules endothéliales n'a pas pu être vérifiée. Il nous serait nécessaire de purifier des cellules endothéliales de l'EM, et cette approche fait actuellement l'objet de perspectives au laboratoire. Par contre, nous avons abordé des points pouvant apporter des éléments de réponse à la deuxième hypothèse. Nous avons étudié les effets de deux substances : le NPY et la galanine.

Le NPY :

Par RT-PCR, nous avons amplifié les ADNc spécifiques des récepteurs Y1 et Y2 au NPY à partir de fragments d'EM, ce qui nous permet de conclure que les ARNm des deux récepteurs sont bien présents dans l'EM. Nos travaux ont montré que la sécrétion spontanée de NO / GnRH dans l'EM de rates en proœstrus 1600h était diminuée significativement lorsque ces EM sont mises en présence d'un antagoniste spécifique du récepteur Y2 au NPY, le BHE0246 (Doods *et al.*, 1999). Par opposition, l'addition d'un antagoniste du récepteur Y1, le BIBP3226 (Xu *et al.*, 2000), ne provoque pas de modifications de la sécrétion spontanée de NO / GnRH.

Comme nous l'avons détaillé précédemment (Introduction, I, *Chapitre 5*, b), le NPY est largement étudié dans le mécanisme de la libération de la GnRH. Ce neuropeptide, très

présent dans l'hypothalamus (Allen *et al.*, 1983 ; McDonald *et al.*, 1988), est indispensable à l'élaboration du pic préovulatoire de GnRH (Wehrenberg *et al.*, 1989), et est libéré au niveau des vaisseaux portes pour moduler la libération de la LH induite par la GnRH (Sutton *et al.*, 1988). En effet, le jour du proœstrus est marqué par une augmentation de la concentration en NPY dans l'EM (Sahu *et al.*, 1989), notamment l'après-midi au niveau des vaisseaux portes hypophysaires (Sutton *et al.*, 1988). Cependant, jusqu'à présent, on considérait que l'apport exogène de NPY sur des fragments hypothalamiques entraînait la libération de la GnRH par une stimulation de récepteurs Y1 (Kalra *et al.*, 1992), situés sur les terminaisons nerveuses des neurones à GnRH et / ou sur les cellules endothéliales (Li *et al.*, 1999). Ce récepteur Y1 a également été observé dans les cellules GT1, et sa stimulation entraîne aussi une libération de la GnRH (Besecke *et al.*, 1994). L'implication du récepteur Y2 dans ce système n'a été étudiée que chez les poissons (Peng *et al.*, 1993) et au niveau des cellules GT1 (Besecke *et al.*, 1994). Notre travail est le premier à montrer l'importance du récepteur Y2 dans la libération de la GnRH chez les mammifères. De plus, nous avons démontré l'existence d'une voie «NPY / Y2 → NO endothélial → GnRH». D'autres travaux ont cependant démontré que le NPY pouvait induire la libération de NO par des cellules endothéliales d'artère cérébrales de rat via les récepteurs Y1 et Y2 au NPY : l'activation de ces récepteurs a entraîné une libération de NO par ces cellules (You *et al.*, 2001). Dans notre système, le blocage du récepteur Y2 provoque une diminution significative de la libération spontanée de NO au stade proœstrus 1600h, stade où la libération de NO est maximale (voir article 1), mais ne l'inhibe pas entièrement. Cette baisse d'activité NO est associée à une diminution de la libération de la GnRH. Le fait que le blocage du récepteur Y1 par le BIBP3226, antagoniste spécifique du récepteur Y1, n'a aucun effet sur la sécrétion spontanée de NO / GnRH, n'est pas contradictoire avec l'étude de Xu *et al.* (2000) : ces auteurs ont montré que l'apport exogène de NPY sur des fragments d'hypothalamus entraînait une libération de GnRH via une

présent dans l'hypothalamus (Allen *et al.*, 1983 ; McDonald *et al.*, 1988), est indispensable à l'élaboration du pic préovulatoire de GnRH (Wehrenberg *et al.*, 1989), et est libéré au niveau des vaisseaux portes pour moduler la libération de la LH induite par la GnRH (Sutton *et al.*, 1988). En effet, le jour du proœstrus est marqué par une augmentation de la concentration en NPY dans l'EM (Sahu *et al.*, 1989), notamment l'après-midi au niveau des vaisseaux portes hypophysaires (Sutton *et al.*, 1988). Cependant, jusqu'à présent, on considérait que l'apport exogène de NPY sur des fragments hypothalamiques entraînait la libération de la GnRH par une stimulation de récepteurs Y1 (Kalra *et al.*, 1992), situés sur les terminaisons nerveuses des neurones à GnRH et / ou sur les cellules endothéliales (Li *et al.*, 1999). Ce récepteur Y1 a également été observé dans les cellules GT1, et sa stimulation entraîne aussi une libération de la GnRH (Besecke *et al.*, 1994). L'implication du récepteur Y2 dans ce système n'a été étudiée que chez les poissons (Peng *et al.*, 1993) et au niveau des cellules GT1 (Besecke *et al.*, 1994). Notre travail est le premier à montrer l'importance du récepteur Y2 dans la libération de la GnRH chez les mammifères. De plus, nous avons démontré l'existence d'une voie «NPY / Y2 \rightarrow NO endothélial \rightarrow GnRH». D'autres travaux ont cependant démontré que le NPY pouvait induire la libération de NO par des cellules endothéliales d'artères cérébrales de rat via les récepteurs Y1 et Y2 au NPY : l'activation de ces récepteurs a entraîné une libération de NO par ces cellules (You *et al.*, 2001). Dans notre système, le blocage du récepteur Y2 provoque une diminution significative de la libération spontanée de NO au stade proœstrus 1600h, stade où la libération de NO est maximale (voir article 1), mais ne l'inhibe pas entièrement. Cette baisse d'activité NO est associée à une diminution de la libération de la GnRH. Le fait que le blocage du récepteur Y1 par le BIBP3226, antagoniste spécifique du récepteur Y1, n'a aucun effet sur la sécrétion spontanée de NO / GnRH, n'est pas contradictoire avec l'étude de Xu *et al.* (2000) : ces auteurs ont montré que l'apport exogène de NPY sur des fragments d'hypothalamus entraînait une libération de GnRH via une

stimulation de récepteur Y1, mais que l'ajout de l'antagoniste sans apport exogène de NPY n'avait aucun effet sur la sécrétion spontanée de la GnRH. Ainsi, dans des conditions physiologiques, le NPY endogène agirait au niveau de l'EM via d'autres types de récepteurs que le récepteur Y1 pour stimuler la libération spontanée de la GnRH. Nous pouvons également supposer que les récepteurs Y1 au NPY interviennent à des stades plus précoces ou plus tardifs du cycle œstral.

La détection des ARNm des récepteurs Y1 et Y2 dans l'EM nous laisse supposer que les cellules endothéliales de l'EM expriment ces récepteurs à leur surface. La stimulation du récepteur Y2 activerait une voie de transduction du signal directement liée à la eNOS, et le NO synthétisé stimulerait alors la libération de la GnRH (FIGURE 13). L'après-midi du proœstrus se caractériserait par une augmentation de la concentration en NPY dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, ce qui stimulerait les récepteurs Y2 de l'EM, provoquant une libération massive de NO nécessaire au déclenchement du pic préovulatoire de GnRH. Le Y1 présent aussi au niveau des cellules endothéliales de l'EM, serait impliqué, au stade proœstrus 16h00, dans d'autres voies de signalisation n'impliquant pas la voie NOergique. Mais nous pouvons aussi supposer que le Y1 puisse intervenir dans une voie dépendante du NO à un stade plus précoce ou plus tardif du cycle œstral que celui testé dans nos manipulations.

En résumé, le NPY est capable de stimuler la sécrétion spontanée de NO / GnRH au niveau de l'EM. Son action se ferait par une stimulation des récepteurs Y2 susceptibles d'être présents au niveau des cellules endothéliales constituant les vaisseaux portes. Le NPY peut donc être un élément partiellement générateur de la pulsativité spontanée de NO, soit en être un élément modulateur.

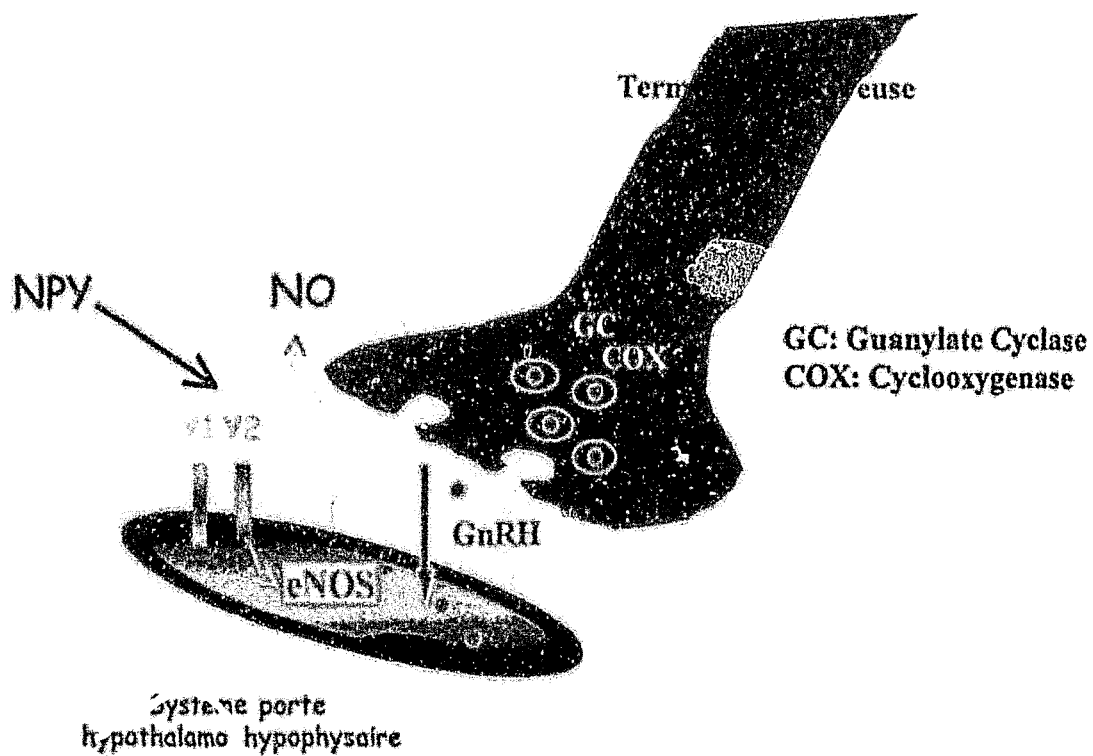


FIGURE 13. Schéma représentant l'hypothèse d'une voie NPY Y2 / NO / GnRH. Les cellules endothéliales de l'EM exprimeraient les récepteurs Y1 et / ou Y2 au NPY. L'activation du récepteur Y2 modulerait la libération de NO d'origine endothéliale.

Au niveau de la zone externe de l'EM, chez l'animal normal, très peu d'axones immunoréactifs pour le NPY ont été mis en évidence. Ceci est le cas, quel que soit le sexe de l'animal et le stade du cycle oestral considéré, y compris le jour du proœstrus, jour où la concentration en NPY augmente dans le sang porte. Il n'existe pas d'explications très rationnelles expliquant la présence de NPY dans le sang porte, alors que les terminaisons nerveuses à NPY sont indécélables dans la zone externe de l'EM. Ceci pourrait éventuellement s'expliquer par le fait que cette sécrétion aurait un aspect très dynamique. Cependant, dans ce cas, on devrait statistiquement déjà avoir observé des terminaisons nerveuses immunoréactives à certaines périodes du cycle oestral. A noter que Ciofi *et al.* (1991) ont observé du NPY dans les cellules dopaminergiques du tractus tubéro-infundibulaire au cours de la lactation.

La galanine :

Nos travaux concernant la galanine sont très intéressants. L'application de galanine à 100 ou 500 nM entraîne une libération de NO associée à une augmentation de la sécrétion basale de la GnRH. Cet effet est inhibé par la galantide, antagoniste des récepteurs à la galanine. L'existence d'une voie galanine / NO a déjà été observée dans d'autres régions du système nerveux central (Consolo *et al.*, 1998), mais c'est la première fois que l'on démontre que la galanine provoque directement une libération de NO par l'EM.

Cependant, le fait que l'action de la galanine sur la libération de la GnRH passe par une libération de NO d'origine endothéliale reste à démontrer : d'autres voies mettant en œuvre des interactions avec d'autres types neuronaux et / ou des cellules gliales peuvent être envisagées. En effet, en présence de L-NIO à 10^{-7} M, l'effet de la galanine (500 nM) sur la

libération de NO diminue considérablement, mais la sécrétion de la GnRH n'est pas perturbée, dans nos conditions expérimentales.

Ceci signifie que la galanine est capable d'induire une libération de NO suffisante pour provoquer une sécrétion de GnRH, mais que la participation de cette voie n'est pas la seule et qu'il reste même à démontrer qu'elle intervient dans la physiologie de la sécrétion de la GnRH. Une autre alternative des modes d'action de la galanine pourrait être une action directe sur des récepteurs localisés sur les terminaisons nerveuses à GnRH elles-mêmes ou sur des terminaisons nerveuses voisines. Ceci est compatible avec des résultats du laboratoire montrant : 1) que les cellules à GnRH possèdent des ARNm codant pour les récepteurs à la galanine de type 1 (Mitchell *et al.*, 1999), et 2) que des sites de liaisons à la galanine sont présents dans l'EM (Dutriez *et al.*, 1997). On peut donc imaginer que des récepteurs aient pu être exportés jusqu'aux terminaisons nerveuses. Il est même probable que d'autres types de récepteurs à la galanine soient présents dans l'EM mais actuellement, faute de pouvoir utiliser des anticorps spécifiques de ces différents récepteurs, il est impossible de répondre clairement à cette question.

Compte tenu de nos résultats, on peut cependant très bien imaginer une double action de la galanine. La première se ferait sur les terminaisons à GnRH et pourrait correspondre à une action autocrine potentialisatrice de la libération. La deuxième pourrait être une action synchronisante : la même galanine pouvant agir sur une libération de NO qui stimulerait les autres terminaisons à GnRH voisines (FIGURE 14).

Dans nos conditions expérimentales, l'utilisation d'une concentration de 500 nM est vraisemblablement trop importante pour pouvoir étudier finement l'importance réciproque des différents modes d'action que nous supposons sur la libération de la GnRH. Il est très possible qu'à cette concentration, la galanine agisse fortement sur les récepteurs localisés sur les terminaisons à GnRH et que la voie NOergique soit masquée.

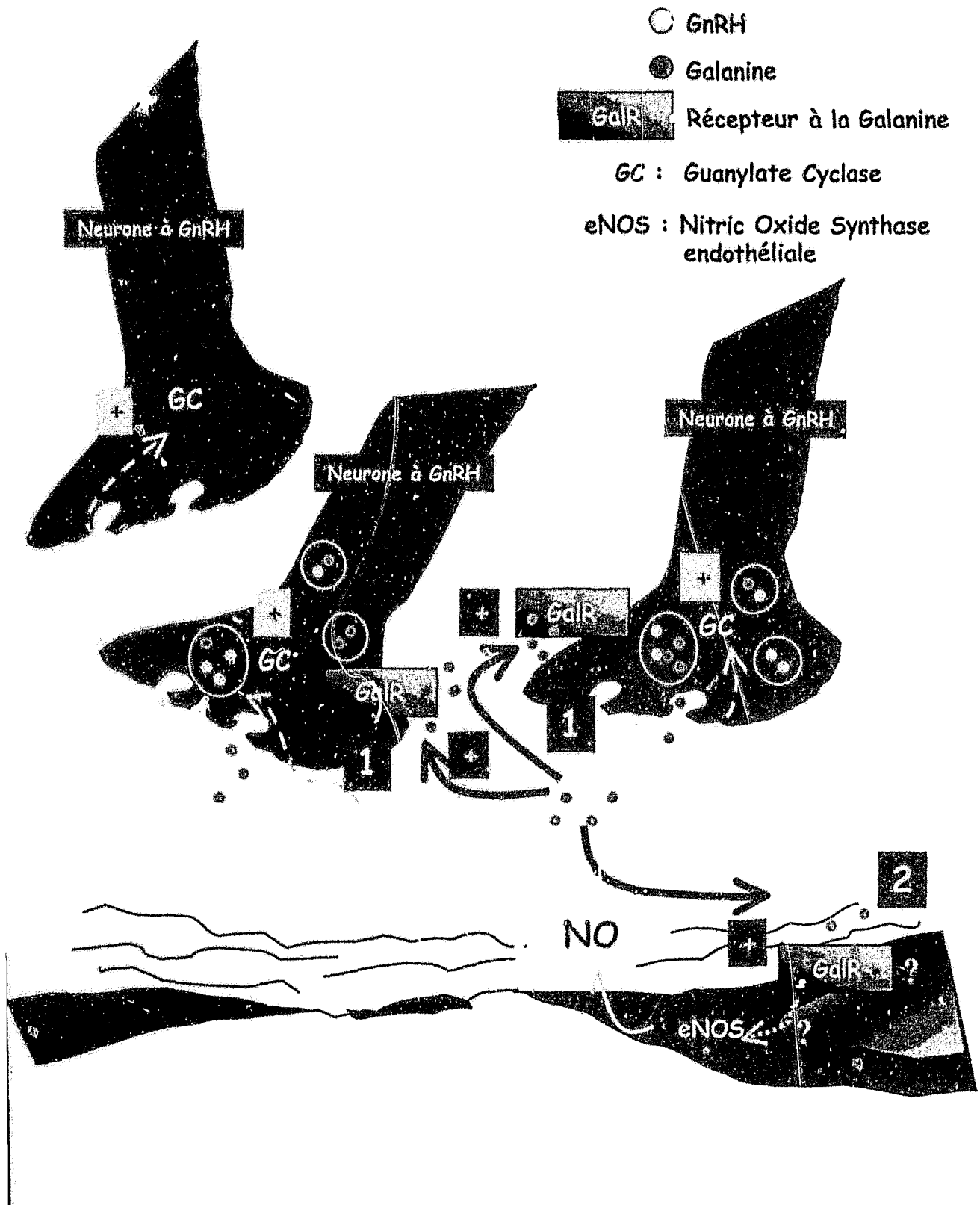


FIGURE 14. Mode d'action hypothétique de la galanine dans l'EM. La galanine libérée par des neurones à GnRH pourrait agir, dans un premier temps, sur les terminaisons neurones à GnRH elles-mêmes (1). La galanine agirait dans un deuxième temps sur les cellules endothéliales de l'EM (2). Cette dernière action aboutirait à une libération de NO d'origine endothéliale qui synchroniserait l'ensemble des terminaisons nerveuses des neurones à GnRH.

Il reste par ailleurs à vérifier que les cellules endothéliales expriment les ARNm des récepteurs à la galanine, car si nos travaux en RT-PCR ont montré que les ARNm des trois types de récepteurs connus sont présents dans l'EM, rien ne nous permet d'affirmer que ces ARNm proviennent bien des cellules endothéliales.

En conclusion, la galanine est susceptible d'induire une libération de NO capable de moduler la stimulation de GnRH. A ce titre, on peut donc penser que ce neuropeptide est susceptible de moduler la pulsativité de NO. Cependant, d'autres voies de signalisation différentes de celle du NO sont suivies par la galanine pour provoquer cette sécrétion de GnRH.

Autres molécules susceptibles d'être impliquées dans le système NO / GnRH au niveau de l'EM :

Notre travail ne s'est intéressé qu'à deux peptides, dont les effets stimulateurs sur la sécrétion de la GnRH étaient déjà connus. Mais de nombreux autres récepteurs, susceptibles d'être présents sur les cellules endothéliales de l'EM, pourraient s'impliquer dans les mécanismes de régulations neurohormonales : certaines études ont montré la présence de récepteurs au glutamate (Krizbai *et al.*, 1998) et à la noradrénaline (Chen *et al.*, 1994) à la surface de cellules endothéliales. Ainsi, d'autres neurotransmetteurs / neuropeptides pourraient avoir la capacité, via des récepteurs membranaires, de se fixer au niveau de l'endothélium, et activer / inhiber l'activité de l'eNOS.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'implication du NO dans le contrôle de la libération de la GnRH était établi clairement depuis de nombreuses années. Cependant, la plupart des résultats démontrant cette implication étaient obtenus par des approches indirectes de mesures du NO. De plus, seul le NO d'origine neuronale semblait être capable d'intervenir sur cette régulation de GnRH. L'originalité de notre travail réside en partie dans le développement, au sein du laboratoire, d'une technique nouvelle permettant, de mesurer directement ce gaz en temps réel, sur du matériel vivant non dissocié et, d'étudier ainsi son mode de libération dans l'EM et son rôle sur la sécrétion de la GnRH.

La première partie de ce travail de thèse démontre l'existence d'une sécrétion spontanée, pulsatile et cyclique de NO par l'EM de rate. Cette sécrétion de NO est corrélée à la libération pulsatile et cyclique de la GnRH dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Les résultats obtenus par ampérométrie indiquent que ces variations de libérations de NO / GnRH par l'EM dépendent de l'imprégnation stéroïdienne qu'a subie l'EM. Le jour du proestrus, l'augmentation de la concentration en œstradiol plasmatique permettrait une augmentation de la libération de NO / GnRH.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons apporté des arguments démontrant que le NO mesuré est essentiellement d'origine endothéliale. Ceci est donc le premier travail qui implique l'endothélium en temps qu'élément sécrétoire dans la libération de la GnRH. Effectivement, l'activité NO accrue mesurée en proestrus serait due

à une augmentation de l'expression de l'eNOS au niveau de l'EM, et parallèlement, à une diminution du taux de protéine inhibitrice cav-1. Ces deux protéines seraient sous l'influence de l'œstradiol qui pourrait les réguler de façon inverse (Pellegrino *et al.*, 1998). La progestérone pourrait avoir un rôle de frein sur l'activité de l'eNOS, en diminuant la transcription de son ARNm, ce qui permettrait un retour à l'état basal de l'activité NO / GnRH après le pic préovulatoire de GnRH / LH : cette étape constituerait ainsi le début de la phase de rétroaction négative.

Le NO pourrait donc être une molécule essentielle pouvant synchroniser les terminaisons nerveuses des neurones à GnRH. L'origine de sa pulsativité reste à déterminer et on peut imaginer que les cellules endothéliales aient elles-mêmes cette propriété. Dans le futur, l'isolement des cellules endothéliales de l'EM nous donnera la possibilité de savoir si ces cellules sont douées intrinsèquement ou non, d'une pulsativité au niveau du NO. Cependant, même si cette pulsativité intrinsèque existe, des modulateurs pourraient aussi influencer le système NOergique au niveau de l'endothélium.

Dans la troisième partie de notre étude, notre attention s'est portée sur deux peptides coanus pour stimuler la libération de la GnRH, à savoir : le NPY et la galanine. Nous avons mis en évidence que l'inhibition du récepteur Y2 au NPY entraînait une chute de la libération de NO / GnRH au stade proœstrus 16h00, ce qui suggère que ce récepteur pourrait être important dans le fonctionnement de l'activité spontanée NO / GnRH. De son côté, la galanine pourrait également être capable d'intervenir dans le système NO / GnRH mais l'importance de cette régulation reste à déterminer.

Ainsi, l'ensemble de nos travaux suggère que les cellules endothéliales pourraient intégrer de nombreux messagers d'origines diverses, neuronale, humorale et

vraisemblablement gliale, et modèleraient ainsi via l'eNOS, la libération de la GnRH. Ce concept, nouveau en neuroendocrinologie, démontre l'existence d'un mode de régulation des sécrétions neurohormonales : la voie cellule endothéliale - neurone.

La poursuite logique de notre travail sera d'étudier d'autres éléments d'origine neuronale, inhibiteurs ou stimulateurs sur la libération de la GnRH dans l'EM, dont les récepteurs sont susceptibles d'être présents à la surface des cellules endothéliales, et qui pourraient intervenir dans le contrôle du système NOergique.

Certains facteurs d'origine gliale et / ou endothéliale, comme le TGF- β 1 (Melcangi *et al.*, 1995 ; Hannan *et al.*, 1988), pourraient également influencer les cellules endothéliales de l'EM qui expriment le récepteur de type I au TGF- β 1 (Prevot *et al.*, 2000).

A plus long terme, nous étudierons l'existence de la voie cellule endothéliale-neurone. Pour cela, nous réaliserons des expériences de cocultures «cellule endothéliale-neurone» : en stimulant ou inhibant l'eNOS, nous observerons les répercussions sur la sécrétion neuronale. Une approche transgénique, chez des animaux knock-out inductible pour l'eNOS au niveau des cellules endothéliales de l'EM, pourra être envisagée pour démontrer le rôle crucial de l'eNOS sur l'activité NO / GnRH.

Le NO n'intervient pas seulement au niveau de la libération de la GnRH. En effet, le rôle du NO dans le phénomène de plasticité neuro-glio-endothéliale au niveau de l'EM devra être étudié, puisque le NO aurait un effet 1) sur la morphogenèse des capillaires (Papapetropoulos *et al.*, 1997 ; Poppa *et al.*, 1998), 2) sur le remaniement rapide du cytosquelette (Ramsell et Cobbett, 1996), et 3) neurogénique sur les terminaisons nerveuses des neurones à GnRH (Hindley *et al.*, 1997). Ces aspects ont déjà fait l'objet de travaux réalisés au laboratoire.

Le mode de libération du NO au niveau de l'APO devra être également contrôlé par ampérométrie. L'influence de ce gaz sur la libération de neuropeptides / neurotransmetteurs, connus pour contrôler l'activité des neurones à GnRH dans l'APO, est à étudier.

L'ensemble de ces travaux aboutiront par la suite à une meilleure compréhension du fonctionnement du «GnRH-pulse generator» et du phénomène de synchronisation des neurones à GnRH, qui sont apparemment liés, au moins en partie, à l'eNOS et aux mouvements calciques. Par ailleurs, nous poursuivons, dans l'immédiat, l'étude des mécanismes d'activation de l'eNOS d'une façon Ca^{2+} indépendante, en nous focalisant sur la protéine kinase Akt.

BIBLIOGRAPHIE

-A-

Adelman JP, Mason AJ, Hayflick JS, Seeburg PH.
Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1986, 83(1):179-183

Aguan K, Mahesh VB, Ping L, Bhat G, Brann DW.
Evidence for a physiological role for nitric oxide in the regulation of the LH surge: effect of central administration of antisense oligonucleotides to nitric oxide synthase.
Neuroendocrinology. 1996, 64(6):449-455

Ajika K.
Simultaneous localization of LHRH and catecholamines in rat hypothalamus.
J Anat. 1979, 128(2):331-347

Allen YS, Adrian TE, Allen JM, Tatemoto K, Crow TJ, Bloom SR, Polak JM.
Neuropeptide Y distribution in the rat brain.
Science. 1983, 221(4613):877-879

Allen LG, Kalra SP.
Evidence that a decrease in opioid tone may evoke preovulatory luteinizing hormone release in the rat.
Endocrinology. 1986, 118(6):2375-2381

Amoss M, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemin R.
Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin
Biochem Biophys Res Commun. 1971, 44:205-210

Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F.
Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1977, 74(8):3203-3207

Aoki E, Takeuchi IK, Shoji R
Nitric oxide: An attractive signaling molecule.
Acta Histochem Cytochem. 1995, 28(2):97-106

Attardi B, Klatt B, Hoffman GE, Smith MS.
Facilitation or inhibition of the estradiol-induced gonadotropin surge in the immature rat by progesterone: regulation of GnRH and LH messenger RNAs and activation of GnRH neurons.
J Neuroendocrinol. 1997, 9(8):589-599

-B-

Barry J
Morphologie et structure de l'infundibulum chez les mammifères.
Rev Eur Endocr 1967, 4:267-304

- Barry J, Dubois MP, Poulain P.
LRF producing cells of the mammalian hypothalamus. A fluorescent antibody study.
Z Zellforsch Mikrosk Anat. 1973a, 146(3):351-366.
- Barry J, Dubois MP, Poulain P, Leonardelli J.
Characteristics and topography of immunoreactive hypothalamic neurons with antibodies against LRF.
C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D 1973b, 276:3191-3193
- Barry J, Dubois MP.
Immunofluorescence study of the preoptico-infundibular LH-RH neurosecretory pathway of the guinea pig during the estrous cycle.
Neuroendocrinology. 1974, 15(3-4):200-208
- Barry J, Poulain P, Carette B.
Pattern and efferent paths of LRH neurons in primates.
Ann Endocrinol (Paris). 1976, 37(4):227-234
- Barry J, Croix D.
Immunofluorescence study of the hypothalamo-infundibular LRH tract and serum gonadotropin levels in the female squirrel monkey during the estrous cycle.
Cell Tissue Res. 1978, 192(2):215-226
- Bartfai T, Langel U, Bedecs K, Andell S, Land T, Gregersen S, Ahren B, Girotti P, Consolo S, Corwin R, et al.
Galanin-receptor ligand M40 peptide distinguishes between putative galanin-receptor subtypes.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993, 90(23):11287-11291
- Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E.
Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophthalmic gonadotropin-releasing hormone.
Science. 1978, 202(4368):631-633
- Belsham DD, Wetsel WC, Mellon PL.
NMDA and nitric oxide act through the cGMP signal transduction pathway to repress hypothalamic gonadotropin-releasing hormone gene expression.
EMBO J. 1996, 15(3):538-547
- Besecke LM, Levine JE.
Acute increase in responsiveness of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone nerve terminals to neuropeptide-Y stimulation before the preovulatory LH surge.
Endocrinology. 1994, 135(1):63-66
- Besecke LM, Wolfe AM, Pierce ME, Takahashi JS, Levine JE.
Neuropeptide Y stimulates luteinizing hormone-releasing hormone release from superfused hypothalamic GT1-7 cells
Endocrinology. 1994, 135(4):1621-1627

- Besedovsky HO, del Rey A.
Immune-neuroendocrine circuits: integrative role of cytokines.
Front Neuroendocrinol. 1992, 13(1):61-94
- Bhat GK, Mahesh VB, Lamar CA, Ping L, Aguan K, Brann DW.
Histochemical localization of nitric oxide neurons in the hypothalamus: association with gonadotropin-releasing hormone neurons and co-localization with N-methyl-D-aspartate receptors.
Neuroendocrinology. 1995, 62(2):187-197
- Bitran M, Tapia W, Eugenin E, Orio P, Boric MP.
Neuropeptide Y induced inhibition of noradrenaline release in rat hypothalamus: role of receptor subtype and nitric oxide.
Brain Res. 1999, 851(1-2):87-93
- Bogdan C.
Nitric oxide and the regulation of gene expression.
Trends Cell Biol. 2001, 11(2):66-75
- Bohme E, Graf H, Schultz G.
Effects of sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants on cyclic GMP formation in muscle and platelets.
Adv Cyclic Nucleotide Res. 1978, 9:131-143
- Bonavera JJ, Sahu A, Kalra PS, Kalra SP.
Evidence that nitric oxide may mediate the ovarian steroid-induced luteinizing hormone surge: involvement of excitatory amino acids.
Endocrinology. 1993, 133(6):2481-2487
- 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, 660(1):175-179
- Bonavera JJ, Kalra PS, Kalra SP.
L-arginine/nitric oxide amplifies the magnitude and duration of the luteinizing hormone surge induced by estrogen: involvement of neuropeptide Y.
Endocrinology. 1996, 137(5):1956-1962
- Bouret S, Prevot V, Croix D, Viltart O, Stefano GB, Mitchell V, Beauvillain JC.
Mu opioid receptor mRNA expression in neuronal nitric oxide synthase-immunopositive preoptic area neurons.
Mol Brain Res. 2000, 80(1):46-52
- Bourguignon JP, Franchimont P.
[Intermittent liberation of gonadoliberin (GnRH) by the rat hypothalamus in vitro].
C R Seances Soc Biol Fil. 1981, 175(3):389-396
- Bourguignon JP, Franchimont P.
Puberty-related increase in episodic LHRH release from rat hypothalamus in vitro.
Endocrinology. 1984, 114(5):1941-1943

- Bourguignon JP, Gerard A, Alvarez Gonzalez ML, Franchimont P.
Control of pulsatile secretion of gonadotrophin releasing hormone from hypothalamic explants.
Hum Reprod. 1993, 8 Suppl 2:18-22
- Branchek TA, Smith KE, Gerald C, Walker MW.
Galanin receptor subtypes.
Trends Pharmacol Sci. 2000, 21(3):109-117
- Brann DW, Mahesh VB.
Endogenous excitatory amino acid involvement in the preovulatory and steroid-induced surge of gonadotropins in the female rat.
Endocrinology. 1991, 128(3):1541-1547
- Brann DW, Putnam CD, Mahesh VB.
Validation of the mechanisms proposed for the stimulatory and inhibitory effects of progesterone on gonadotropin secretion in the estrogen-primed rat. a possible role for adrenal steroids.
Steroids. 1991, 56(2):103-111
- Brann DW.
Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation.
Neuroendocrinology. 1995, 61(3):213-225
- Bredt DS, Snyder SH.
Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1990, 87(2):682-685
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH.
Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase.
Neuron. 1991, 7(4):615-624
- Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH.
Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C and calcium calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites.
J Biol Chem. 1992, 267(16):10976-10981
- Brightman MW, Reese TS.
Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain.
J Cell Biol. 1969, 40(3):648-677
- Bronstein DM, Schafer MK, Watson SJ, Akil H.
Evidence that beta-endorphin is synthesized in cells in the nucleus tractus solitarius: detection of POMC mRNA.
Brain Res. 1992, 587(2):269-275
- Brune B, Lapetina EG.
Phosphorylation of nitric oxide synthase by protein kinase A.
Biochem Biophys Res Commun. 1991, 181(2):921-926

Burgus R, Butcher M, Amoss M, Ling N, Monahan M, Rivier J, Fellows R, Blackwell R, Vale W, Guillemin R.

Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF) (LH-hypothalamus-LRF-gaschromatography-mass spectrometry-decapeptide-Edman degradation). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972, 69(1):278-282

Buseoni L, Michel T.

Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization.

J Biol Chem. 1993, 268(12):8410-8413

-C-

Caillol M, Devinoy E, Lacroix MC, Schirar A.

Endothelial and neuronal nitric oxide synthases are present in the suprachiasmatic nuclei of Syrian hamsters and rats.

Eur J Neurosci. 2000, 12(2):649-661

Calka J, Block CH.

Relationship of vasopressin with NADPH-diaphorase in the hypothalamo-neurohypophysial system.

Brain Res Bull. 1993, 32(3):207-210

Calogero AE, Burrello N, Ossino AM, Polosa P, D'Agata R.

Activin-A stimulates hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release by the explanted male rat hypothalamus: interaction with inhibin and androgens.

J Endocrinol. 1998, 156(2):269-274

Caberlotto L, Fuxe K, Rimland JM, Sedvall G, Hurd YL.

Regional distribution of neuropeptide Y Y2 receptor messenger RNA in the human post mortem brain.

Neuroscience. 1998, 86(1):167-178

Canteras G, Rettori V, Genaro A, Suburo A, Gimeno M, McCann SM.

Nitric oxide synthase content of hypothalamic explants: increase by norepinephrine and inactivated by NO and cGMP.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1996, 93(9):4246-4250

Caraty A, Locatelli A, Martin GB.

Biphasic response in the secretion of gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected with oestradiol.

J Endocrinol. 1989, 123(3):375-382

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, 99(1):243-248

Caprio M, Fabbrini E, Isidori AM, Aversa A, Fabbri A.
Leptin in reproduction.
Trends Endocrinol Metab. 2001, 12(2):65-72

Casey PJ.
Protein lipidation in cell signaling.
Science. 1995, 268(5208):221-225

Chappell PE, Schneider JS, Kim P, Xu M, Lydon JP, O'Malley BW, Levine JE.
Absence of gonadotropin surges and gonadotropin-releasing hormone self-priming in ovariectomized (OVX), estrogen (E2)-treated, progesterone receptor knockout (PRKO) mice.
Endocrinology. 1999, 140(8):3653-3658

Chappell PE, Levine JE.
Stimulation of gonadotropin-releasing hormone surges by estrogen. I. Role of hypothalamic progesterone receptors.
Endocrinology. 2000a, 141(4):1477-1485

Chappell PE, Lee J, Levine JE.
Stimulation of gonadotropin-releasing hormone surges by estrogen. II. Role of cyclic adenosine 3'5'-monophosphate.
Endocrinology. 2000b, 141(4):1486-1492

Chehab FF.
Leptin as a regulator of adipose mass and reproduction.
Trends Pharmacol Sci. 2000, 21(8):309-314

Chen DZ, Ohkuma S, Kuriyama K.
Characteristics of nitric oxide-evoked [³H]taurine release from cerebral cortical neurons.
Neurochem Int. 1996, 28(5-6):601-607

Chen HI, Li HT, Chen CC.
Physical conditioning decreases norepinephrine induced vasoconstriction in rabbits. Possible roles of norepinephrine-evoked endothelium-derived relaxing factor.
Circulation. 1994, 90(2):970-975

Cherubini E, Gajarsa JL, Ben-Ari Y.
GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life.
Trends Neurosci. 1991, 14(12):515-519

Cherry PD, Furchgott RF, Zawadzki JV, Jothianandan D.
Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1982, 79(6):2106-2110

Ching M.
Correlative surges of LHRH, LH and FSH in pituitary stalk plasma and systemic plasma of rat during proestrus. Effect of anesthetics.
Neuroendocrinology. 1982, 34(4):279-285

Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C.
Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages.
J Exp Med. 1992, 176(2):599-604

Ciofi P, Fallon JH, Croix D, Polak JM, Tramu G.
Expression of neuropeptide Y precursor-immunoreactivity in the hypothalamic dopaminergic
tubero-infundibular system during lactation in rodents.
Endocrinology. 1991, 128(2):823-834

Clarke IJ, Cummins JT.
The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing
hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes.
Endocrinology. 1982, 111(5):1737-1739

Clarke IJ, Cummins JT.
Increased gonadotropin-releasing hormone pulse frequency associated with estrogen-induced
luteinizing hormone surges in ovariectomized ewes.
Endocrinology. 1985, 116(6):2376-2383

Consolo S, Uboldi MC, Caltavuturo C, Bartfai T.
Galanin stimulates the N-methyl-D-aspartate receptor/nitric oxide/cyclic GMP pathway in
vivo in the rat ventral hippocampus.
Neuroscience. 1998, 85(3):819-826

Costa A, Trainer P, Besser M, Grossman A.
Nitric oxide modulates the release of corticotropin-releasing hormone from the rat
hypothalamus in vitro.
Brain Res. 1993, 605(2):187-192

Crowley WR, Kalra SP.
Neuropeptide Y stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from medial
basal hypothalamus in vitro: modulation by ovarian hormones.
Neuroendocrinology. 1987, 46(2):97-103

-D-

Dawson TM, Bredt 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, 88(17):7797-7801

Dawson TM, Sasaki M, Gonzalez-Zulueta M, Dawson VL.
Regulation of neuronal nitric oxide synthase and identification of novel nitric oxide signaling
pathways.
Prog Brain Res. 1998, 118:3-11

Degerman E, Belfrage P, Manganiello VC.
Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3).
J Biol Chem. 1997, 272(11):6823-6826

- de Groot JJ, Veldink GA, Vliegthart JF, Boldingh J, Wever R, van Gelder BF.
Demonstration by EPR spectroscopy of the functional role of iron in soybean lipoxygenase-1.
Biochim Biophys Acta. 1975, 377(1):71-79
- DePaolo LV.
Attenuation of preovulatory gonadotrophin surges by epostane: a new inhibitor of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase.
J Endocrinol. 1988, 118(1):59-68
- de la Torre JC, Stefano GB.
Evidence that Alzheimer's disease is a microvascular disorder: the role of constitutive nitric oxide.
Brain Res Brain Res Rev. 2000, 34(3):119-136
- De Quidt ME, Kiyama H, Emon PC.
Pancreatic polypeptide, neuropeptide Y and peptide YY in central neurons.
Handbook of Chemical Neuroanatomy. 1990, Part II, Chapitre IV:287-357
- DeWitt DL.
Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression.
Biochim Biophys Acta. 1991, 1083(2):121-134
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM.
Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.
Nature. 1999, 399(6736):601-605
- Dinerman JL, Steiner JP, Dawson TM, Dawson V, Snyder SH.
Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity.
Neuropharmacology. 1994a, 33(11):1245-1251
- Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH.
Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1994b, 91(10):4214-4218
- Dhuzen DE, Ramirez VD.
In vivo activity of the LHRH pulse generator as determined with push-pull perfusion of the anterior pituitary gland of unrestrained intact and castrate male rats.
Neuroendocrinology. 1987, 45(4):328-333
- Doods H, Gaida W, Wieland HA, Dollinger H, Schnorrenberg G, Esser F, Engel W, Eberlein W, Rudolf K.
BHE0246: a selective and high affinity neuropeptide Y Y(2) receptor antagonist.
Eur J Pharmacol. 1999, 384(2-3):R3-5
- Drewett JG, Garbers DL.
The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands.
Endocr Rev. 1994, 15(2):135-162

Duittoz AH, Batailler M.
Pulsatile GnRH secretion from primary cultures of sheep olfactory placode explants.
J Reprod Fertil. 2000, 120(2):391-396

Dutriez J, Lagny-Pourmir I, Epelbaum J, Beauvillain JC.
Ultrastructural localization of galanin and galanin receptors in the guinea pig median eminence.
Brain Res. 1997, 753(1):36-46

-E-

Eyigor O, Jennes L.
Kainate receptor subunit-positive gonadotropin-releasing hormone neurons express c-Fos during the steroid-induced luteinizing hormone surge in the female rat.
Endocrinology. 2000, 141(2):779-786

-F-

Faletti AG, Mastronardi CA, Lomniczi A, Seilicovich A, Gimeno M, McCann SM, Rettori V.
beta-Endorphin blocks luteinizing hormone-releasing hormone release by inhibiting the nitric oxide pathway controlling its release.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999, 96(4):1722-1726

Fernald RD, White RB.
Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions.
Front Neuroendocrinol. 1999, 20(3):224-240

Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T.
Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells.
J Biol Chem. 1996, 271(37):22810-22814

Feron O, Saldana F, Michel JB, Michel T.
The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle.
J Biol Chem. 1998, 273(6):3125-3128

Feron O.
Endothelial nitric oxide synthase expression and its functionality.
Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 1999, 2(4):291-296

Feron O, Dessy C, Desager JP, Balligand JL.
NADPH-dependent hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance.
Circulation. 2001, 103(1):113-118

Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL.
Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment.
Nature. 1985, 313(6000):310-313

Finley JC, Lindstrom P, Petrusz P.

Immunocytochemical localization of beta-endorphin-containing neurons in the rat brain.
Neuroendocrinology. 1981, 33(1):28-42

Forstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F.

Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991, 88(5):1788-1792

Forstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H.

Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control.
Biochem Pharmacol. 1995, 50(9):1321-1332

Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H.

Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III).

FASEB J. 1998, 12(10):773-790

Freeman MC, Dupke KC, Croteau CM.

Extinction of the estrogen-induced daily signal for LH release in the rat: a role for the proestrous surge of progesterone.
Endocrinology. 1976, 99(1):223-229

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC.

Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt.
Nature. 1999, 399(6736):597-601

Funabashi T, Daikoku S, Shinohara K, Kimura F.

Pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion is an inherent function of GnRH neurons, as revealed by the culture of medial olfactory placode obtained from embryonic rats.
Neuroendocrinology. 2000, 71(2):138-144.

Furchgott RF, Zawadzki JV.

The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.

Nature. 1980, 288(5789):373-376

-G-

Gabriel SM, Berglund LA, Simpkins JW.

A decline in endogenous opioid influence during the steroid-induced hypersecretion of luteinizing hormone in the rat.

Endocrinology. 1986, 118(2):558-566

Galbiati M, Zanisi M, Messi E, Cavarretta I, Martini L, Melcangi RC.

Transforming growth factor-beta and astrocytic conditioned medium influence luteinizing hormone-releasing hormone gene expression in the hypothalamic cell line GT1.

Endocrinology. 1996, 137(12):5605-5609

- Garbers DL, Lowe DG.
Guanylyl cyclase receptors.
J Biol Chem. 1994, 269(49):30741-30744
- Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC.
Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo.
J Biol Chem. 1997, 272(41):25437-25440
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R.
Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain.
Nature. 1988, 336(6197):385-388
- Garthwaite J, Boulton CL.
Nitric oxide signaling in the central nervous system.
Annu Rev Physiol. 1995, 57:683-706
- Gath U, Hakvoort A, Wegener J, Decker S, Galla HJ.
Porcine choroid plexus cells in culture: expression of polarized phenotype, maintenance of barrier properties and apical secretion of CSF-components.
Eur J Cell Biol. 1997, 74(1):68-78
- Gautron JP, Pattou E, Bauer K, Kordon C.
(Hydroxyproline⁹) luteinizing hormone releasing hormone: a novel peptide in mammalian and frog hypothalamus.
Neurochem Int 1991, 18:221-235
- Gearing M, Terasawa E.
Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neuroterminals mapped using the push-pull perfusion method in the rhesus monkey.
Brain Res Bull. 1988, 21(1):117-121
- Getting SJ, Segieth J, Ahmad S, Biggs CS, Whitton PS.
Biphasic modulation of GABA release by nitric oxide in the hippocampus of freely moving rats *in vivo*.
Brain Res. 1996, 717(1-2):196-199
- Ghosh S, Gachhui R, Crooks C, Wu C, Lisanti MP, Stuehr DJ.
Interaction between caveolin-1 and the reductase domain of endothelial nitric-oxide synthase. Consequences for catalysis.
J Biol Chem. 1998, 273(35):22267-22271
- Gonzalez-Manchon C, Bilezikjian LM, Corrigan AZ, Mellon PL, Vale W.
Activin-A modulates gonadotropin-releasing hormone secretion from a gonadotropin-releasing hormone-secreting neuronal cell line.
Neuroendocrinology. 1991, 54(4):373-377

Gross PM, Weaver DF, Bowers RJ, Nag S, Ho LT, Pang JJ, Espinosa FJ.
Neurotoxicity in conscious rats following intraventricular SNAP, a nitric oxide donor.
Neuropharmacology. 1994, 33(7):915-927

Grossman A.
NO news is good news.
Endocrinology. 1994, 134(3):1003-1005

Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ, Ignarro L.
Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine.
J Cyclic Nucleotide Res. 1979, 5(3):211-224

Guevara-Guzman R, Emson PC, Kendrick KM.
Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP.
J Neurochem. 1994, 62(2):807-810

Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S.
Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans.
Biochem Biophys Res Commun. 1991, 181(2):852-857

-H-

Haley JE, Schuman EM.
Involvement of nitric oxide in synaptic plasticity and learning.
Seminars in the Neurosciences 1994, 6:11-20

Hannan RL, Kourembanas S, Flanders KC, Rogelj SJ, Roberts AB, Faller DV, Klagsbrun M.
Endothelial cells synthesize basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta.
Growth Factors. 1988, 1(1):7-17

Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Bohme E, Schultz G.
Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl cyclase.
Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme.
FEBS Lett. 1991, 292(1-2):217-222

Hayashi Y, Nishio M, Naito Y, Yokokura H, Nimura Y, Hidaka H, Watanabe Y.
Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases.
J Biol Chem. 1999, 274(29):20597-20602

Hecker M, Mitchell JA, Harris HJ, Katsura M, Thiemermann C, Vane JR.
Endothelial cells metabolize NG-monomethyl-L-arginine to L-citrulline and subsequently to L-arginine.
Biochem Biophys Res Commun. 1990, 167(3):1037-1043

Herbison AE, Theodosios DT.

Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat.

Neuroscience. 1992, 50(2):283-298

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(1):73-82

Herbison AE.

Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons.

Endocr Rev. 1998, 19(3):302-330

Hevel JM, White KA, Marletta MA.

Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein.

J Biol Chem. 1991, 266(34):22789-22991

Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z.

Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite.

Science. 1987, 235(4787):473-476

Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM.

Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule.

Biochem Biophys Res Commun. 1988, 157(1):87-94

Hindley S, Juurlink BH, Gysbers JW, Middlemiss PJ, Herman MA, Rathbone MP.

Nitric oxide donors enhance neurotrophin-induced neurite outgrowth through a cGMP-dependent mechanism.

J Neurosci Res. 1997, 47(4):427-439

Hoffman GE, Gibbs FP.

LHRH pathways in rat brain: 'deafferentation' spares a sub-chiasmatic LHRH projection to the median eminence.

Neuroscience. 1982, 7(8):1979-1993

Hosny S, Jennes L.

Identification of gap junctional connexin-32 mRNA and protein in gonadotropin-releasing hormone neurons of the female rat.

Neuroendocrinology. 1998, 67(2):101-108

Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszan T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL.

Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain.

Endocrinology. 2000, 141(9):3506-3509

Hrabovszky E, Steinhauer A, Barabas K, Shughrue PJ, Petersen SL, Merchenthaler I, Liposits Z.

Estrogen receptor-beta immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain.

Endocrinology. 2001, 142(7):3261-3264

-I-

Ignarro LJ, Adams JB, Horwitz PM, Wood KS.

Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange.

Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms.

J Biol Chem. 1986, 261(11):4997-5002

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G.

Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1987, 84(24):9265-9269

Ignarro LJ.

Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties.

FASEB J. 1989, 3(1):31-36

-J-

Jablonka-Shariff A, Olson LM.

The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes.

Endocrinology. 1998, 139(6):2944-2954

Jablonka-Shariff A, Ravi S, Beltsos AN, Murphy LL, Olson LM.

Abnormal estrous cyclicity after disruption of endothelial and inducible nitric oxide synthase in mice.

Biol Reprod. 1999, 61(1):171-177

Latero DR.

Nitric oxide (NO)-related pharmaceuticals: contemporary approaches to therapeutic NO modulation.

Free Radic Biol Med. 2000, 28(10):1495-1506

Jennes L, Stumpf WE.

LHRH-systems in the brain of the golden hamster.

Cell Tissue Res. 1980, 209(2):239-256

Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC.

Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity.

J Biol Chem. 1997, 272(30):18522-18555

Jung H, Shannon EM, Fritschy JM, Ojeda SR.
Several GABAA receptor subunits are expressed in LHRH neurons of juvenile female rats.
Brain Res. 1998, 780(2):218-229

-K-

Kaehler ST, Singewald N, Sinner C, Philippu A.
Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus.
Brain Res. 1999, 835(2):346-349

Kalra PS, Fuentes M, Sahu A, Kalra SP.
Endogenous opioid peptides mediate the interleukin-1-induced inhibition of the release of hormone (LH)-releasing hormone and LH.
Endocrinology. 1990a, 127(5):2381-2386

Kalra PS, Sahu A, Kalra SP.
Interleukin-1 inhibits the ovarian steroid-induced luteinizing hormone surge and release of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone in rats.
Endocrinology. 1990b, 126(4):2145-2152

Kalra SP, Fuentes M, Fournier A, Parker SL, Crowley WR.
Involvement of the Y-1 receptor subtype in the regulation of luteinizing hormone secretion by neuropeptide Y in rats.
Endocrinology. 1992, 130(6):3323-3330

Kalra SP.
Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge.
Endocr Rev. 1993, 14(5):507-538

Kalyanaraman B, Mason RP, Tainer B, Eling TE.
The free radical formed during the hydroperoxide-mediated deactivation of ram seminal vesicles is hemoprotein-derived.
J Biol Chem. 1982, 257(9):4764-4768

Karanth S, Lyson K, McCann SM.
Role of nitric oxide in interleukin 2-induced corticotropin-releasing factor release from incubated hypothalami.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993, 90(8):3383-3387

Kasten TL, White SA, Norton TT, Bond CT, Adelman JP, Fernald RD.
Characterization of two new preproGnRH mRNAs in the tree shrew: first direct evidence for mesencephalic GnRH gene expression in a placental mammal.
Gen Comp Endocrinol. 1996, 104(1):7-19

Katsuki S, Arnold WP, Murad F.
Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues.
J Cyclic Nucleotide Res. 1977, 3(4):239-247

- Katsuura G, Gottschall PE, Arimura A.
Identification of a high-affinity receptor for interleukin-1 beta in rat brain.
Biochem Biophys Res Commun. 1988, 156(1):61-67
- Eaulman JM, Kesner JS, Wilson RC, Knobil E.
Electrophysiological manifestation of luteinizing hormone-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey: influence of alpha-adrenergic and dopaminergic blocking agents.
Endocrinology. 1985, 116(4):1327-1333
- Kawakami M, Uemura T, Hayashi R.
Electrophysiological correlates of pulsatile gonadotropin release in rats.
Neuroendocrinology. 1982, 35(1):63-67
- Kawakami S, Ichikawa M, Yokosuka M, Tsukamura H, Maeda K.
Glial and neuronal localization of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity in the median eminence of female rats.
Brain Res. 1998a, 789(2):322-326
- Kawakami SI, Hirunagi K, Ichikawa M, Tsukamura H, Maeda KI.
Evidence for terminal regulation of GnRH release by excitatory amino acids in the median eminence in female rats: a dual immunoelectron microscopic study.
Endocrinology. 1998b, 139(3):1458-1461
- Kawano H, Daikoku S.
Immunohistochemical demonstration of LHRH neurons and their pathways in the rat hypothalamus.
Neuroendocrinology. 1981, 32(3):179-186
- Kerr NC, Holmes FE, Wynick D.
Galanin-like peptide (GALP) is expressed in rat hypothalamus and pituitary, but not in DRG.
Neuroreport. 2000, 11(17):3909-3913
- Kim K, Ramirez VD.
In vitro luteinizing hormone-releasing hormone release from superfused rat hypothalamus: site of action of progesterone and effect of estrogen priming.
Endocrinology. 1985, 116(1):252-258
- King JA, Steneveld AA, Curlewis JD, Rissman EF, Millar RP.
Identification of chicken GnRH II in brains of metatherian and early-evolved eutherian species of mammals.
Regul Pept. 1994, 54(2-3):467-477
- King JC, Tobet SA, Snavely FL, Arimura AA.
LHRH immunopositive cells and their projections to the median eminence and organum vasculosum of the lamina terminalis.
J Comp Neurol. 1982, 209(3):287-300

Klatt P, Pfeiffer S, List M, Lehner D, Glatter O, Bachinger HP, Werner ER, Schmidt K, Mayer B.

Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin.
J Biol Chem. 1996, 271(13):7336-7342

Kohsaka A, Watanobe H, Kakizaki Y, Suda T.

A comparative study of the effects of nitric oxide and carbon monoxide on the in vivo release of gonadotropin-releasing hormone and neuropeptide Y from rat hypothalamus during the estradiol-induced luteinizing hormone surge: estimation by push-pull perfusion.
Neuroendocrinology. 1999, 69(4):245-253

Krizhai JA, Deli MA, Pestenecz A, Siklos L, Szabo CA, Andras I, Joo F.

Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells.
J Neurosci Res. 1998, 54(6):814-819

-L-

Lamar CA, Bhat GK, Mahesh VB, Brann DW.

Evidence that neuronal nitric oxide synthase but not heme oxygenase increases in the hypothalamus on proestrus afternoon.
Neuroendocrinology. 1999, 70(5):360-367

Law A, Gauthier S, Quirion R.

Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type.
Brain Res Rev. 2001, 35(1):73-96

Lechan RM, Toni R, Clark BD, Cannon JG, Shaw AR, DiMarcello CA, Reichlin S.

Immunoreactive interleukin-1 beta localization in the rat forebrain.
Brain Res. 1990, 514(1):135-140

Lee S, Rivier C.

Effect of repeated activin-A treatment on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of the adult male rat.
Biol Reprod. 1997, 56(4):969-975

Lee WS, Smith MS, Hoffman GE.

Progesterone enhances the surge of luteinizing hormone by increasing the activation of luteinizing hormone-releasing hormone neurons.
Endocrinology. 1990, 127(5):2604-2606

Lee S, Kim CK, Rivier C.

Nitric oxide stimulates ACTH secretion and the transcription of the genes encoding for NGFI-B, corticotropin-releasing factor, corticotropin-releasing factor receptor type 1, and vasopressin in the hypothalamus of the intact rat.
J Neurosci. 1999, 19(17):7640-7647

Leonardelli J, Barry J, Dubois MP.

Demonstration by fluorescent antibody technic of a substance immunologically related to LH-RF in hypothalamus and median eminence in mammals.

C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D. 1973, 276(13):2042-2046

Levine JE, Ramirez VD.

Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy as estimated with push-pull cannulae.

Endocrinology. 1982, 111(5):1439-1448

Levine JE, Pau KY, Ramirez VD, Jackson GL.

Simultaneous measurement of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone release in unanesthetized, ovariectomized sheep.

Endocrinology 1982, 111(5):1449-1455

Levine JE, Duffy MT.

Simultaneous measurement of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone, LH, and follicle-stimulating hormone release in intact and short-term castrate rats.

Endocrinology. 1988, 122(5):2211-2221

Li C, Chen P, Smith MS.

Morphological evidence for direct interaction between arcuate nucleus neuropeptide Y (NPY) neurons and gonadotropin-releasing hormone neurons and the possible involvement of NPY Y1 receptors.

Endocrinology. 1999, 140(11):5382-5390.

Lincoln TM, Cornwell TL.

Intracellular cyclic GMP receptor proteins.

FASEB J. 1993, 7(2):328-338

Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR.

Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases.

Trends Biochem Sci. 1997, 22(8):307-312

Lonart G, Wang J, Johnson KM.

Nitric oxide induces neurotransmitter release from hippocampal slices.

Eur J Pharmacol. 1992, 220(2-3):271-272

Lonart G, Cassels KL, Johnson KM.

Nitric oxide induces calcium-dependent [³H]dopamine release from striatal slices.

J Neurosci Res. 1993, 35(2):192-198

Lopez EJ, Domina AO, Negro-Vilar A.

Endogenous excitatory amino acid neurotransmission regulates the estradiol-induced LH surge in ovariectomized rats.

Endocrinology. 1990, 126(3):1771-1773

Lopez FJ, Negro-Vilar A.

Galanin stimulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion from arcuate nucleus-median eminence fragments in vitro. involvement of an alpha-adrenergic mechanism.
Endocrinology. 1990, 127(5):2431-2436

Lopez FJ, Merchenthaler I, Ching M, Wisniewski MG, Negro-Vilar A.

Galanin: a hypothalamic-hypophysiotropic hormone modulating reproductive functions.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991, 88(10):4508-4512

Lopez FJ, Moretto M, Merchenthaler I, Negro-Vilar A.

Nitric oxide is involved in the genesis of pulsatile LHRH secretion from immortalized LHRH neurons.

J Neuroendocrinol. 1997, 9(9):647-654

Lopez FJ, Merchenthaler IJ, Moretto M, Negro-Vilar A.

Modulating mechanisms of neuroendocrine cell activity: the LHRH pulse generator.
Cell Mol Neurobiol. 1998, 18(1):125-146

Lopez-Figueroa MO, Day HE, Akit H, Watson SJ.

Nitric oxide in the stress axis.

Histol Histopathol. 1998, 13(4):1243-1252

Lorrain DS, Hall EM.

Nitric oxide increases dopamine and serotonin release in the medial preoptic area.

Neuroreport. 1993, 5(1):87-89

-M-

Ma YJ, Berg-von der Emde K, Rage F, Wetsel WC, Ojeda SR.

Hypothalamic astrocytes respond to transforming growth factor-alpha with the secretion of neuroactive substances that stimulate the release of luteinizing hormone-releasing hormone.

Endocrinology. 1997, 138(1):19-25

McNeill AM, Kim N, Duckles SP, Krause DN, Kontos HA.

Chronic estrogen treatment increases levels of endothelial nitric oxide synthase protein in rat cerebral microvessels.

Stroke. 1999, 30(10):2186-2190

Maier JA, Hla T, Maciag T.

Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells.

J Biol Chem. 1990, 265(19):10805-10808

Magni P, Vettor R, Pagano C, Calcagno A, Beretta E, Messi E, Zanisi M, Martini L, Motta M.

Expression of a leptin receptor in immortalized gonadotropin-releasing hormone-secreting neurons.

Endocrinology. 1999, 140(4):1581-1585

- McCann SM, Taleisnek S, Friedman HM.
LH releasing activity in hypothalamic extracts.
Proc Soc Exp Biol Med. 1960, 104:432-434
- McCann SM.
A hypothalamic luteinizing hormone factor.
Am J Physiol. 1962, 202:432-434
- McDonald JK, Koenig JL, Gibbs DM, Collins P, Noe BD.
High concentrations of neuropeptide Y in pituitary portal blood of rats.
Neuroendocrinology. 1987, 46(6):538-541
- McDonald JK.
NPY and related substances.
Crit Rev Neurobiol. 1988, 4(1):97-135
- Mahachekertwattana P, Black SM, Kaplan SL, Brisson JD, Grumbach MM.
Nitric oxide synthesized by gonadotropin-releasing hormone neurons is a mediator of N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced GnRH secretion.
Endocrinology. 1994, 135(4):1709-1712
- Mahesh VB, Brann DW.
Regulation of the preovulatory gonadotropin surge by endogenous steroids.
Steroids. 1998, 63(12):616-629
- Malinski T, Taha Z.
Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor.
Nature. 1992, 358(6388):676-678
- Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, Chopp M.
Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion.
J Cereb Blood Flow Metab. 1993, 13(3):355-358
- Mani SK, Allen JM, Rettori V, McCann SM, O'Malley BW, Clark JH.
Nitric oxide mediates sexual behavior in female rats.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1994, 91(13):6468-6472
- Maples KR, Sandstrom T, Su YF, Henderson RF.
The nitric oxide/heme protein complex as a biologic marker of exposure to nitrogen dioxide in humans, rats, and in vitro models.
Am J Respir Cell Mol Biol. 1991, 4(6):538-543
- Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS.
Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate.
Biochemistry. 1988, 27(24):8706-8711
- Marletta MA.
Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis.
Cell. 1994, 78(6):927-930

Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene.

J Biol Chem. 1993. 268(23):17478-17488

Marshall PE, Goldsmith PC.

Neuroregulatory and neuroendocrine GnRH pathways in the hypothalamus and forebrain of the baboon.

Brain Res. 1980, 193(2):353-372

Martinez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI.

Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses: intrinsic properties of the GT1-1 GnRH neuronal cell line.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1992, 89(5):1852-1855

Martinez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI.

Signaling pathways involved in GnRH secretion in GT1 cells.

Neuroendocrinology. 1995, 61(3):310-317

Masferrer JL, Seibert K, Zweifel B, Needleman P.

Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1992, 89(9):3917-3921

Matesic DF, Germak JA, Dupont E, Madhukar BV.

Immortalized hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone neurons express a connexin26-like protein and display functional gap junction coupling assayed by fluorescence recovery after photobleaching.

Neuroendocrinology. 1993, 58(5):485-492

Matsumoto H, Noguchi J, Takatsu Y, Horikoshi Y, Kumano S, Ohtaki T, Kitada C, Itoh T, Onda H, Nishimura O, Fujino M.

Stimulation effect of galanin-like peptide (GALP) on luteinizing hormone-releasing hormone-mediated luteinizing hormone (LH) secretion in male rats.

Endocrinology. 2001, 142(8):3693-3696

Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV.

Classic pages in obstetrics and gynecology. Structure of the porcine LH-and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence.

Biochemical and Biophysical Research Communications. 1971 43:1334-1339

Mayer B, John M, Bohme F.

Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum.

Cofactor-role of tetrahydrobiopterin.

FEBS Lett. 1990, 277(1-2):215-219

Melcangi RC, Galbiati M, Messi E, Piva F, Martini L, Motta M.

Type I astrocytes influence luteinizing hormone-releasing hormone release from the hypothalamic cell line GT1-1: is transforming growth factor-beta the principle involved?

Endocrinology. 1995, 136(2):679-686

- Mellion BT, Ignarro LJ, Cholewin EH, Pontecorvo EG, Hyman AL, Kadowitz PJ.
Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators.
Blood. 1981, 57(5):946-955
- Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI.
Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis.
Neuron. 1990, 5(1):1-10
- Merchenthaler I, Kovacs G, Lavasz G, Setalo G.
The preoptico-infundibular LH-RH tract of the rat.
Brain Res. 1980, 198(1):63-74
- Merchenthaler I, Gores T, Setalo G, Petrusz P, Flerko B.
Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain.
Cell Tissue Res. 1984, 237(1):15-29
- Merchenthaler I, Setalo G, Csontos C, Petrusz P, Flerko B, Negro-Vilar A.
Combined retrograde tracing and immunocytochemical identification of luteinizing hormone-releasing hormone- and somatostatin-containing neurons projecting to the median eminence of the rat.
Endocrinology. 1989, 125(6):2812-2821
- Merchenthaler I, Lopez FJ, Negro-Vilar A.
Colocalization of galanin and luteinizing hormone-releasing hormone in a subset of preoptic hypothalamic neurons: anatomical and functional correlates.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1990, 87(16):6326-6330
- Merchenthaler I, Lopez FJ, Lennard DE, Negro-Vilar A.
Sexual differences in the distribution of neurons coexpressing galanin and luteinizing hormone-releasing hormone in the rat brain.
Endocrinology. 1991, 129(4):1977-1986
- Messi E, Galbiati M, Magnaghi V, Zucchi I, Martini L, Melcangi RC.
Transforming growth factor beta2 is able to modify mRNA levels and release of luteinizing hormone-releasing hormone in a immortalized hypothalamic cell line (GT1-1).
Neurosci Lett. 1999, 270(3):165-168
- Michel T, Li GK, Busconi L.
Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993, 90(13):6252-6256
- Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T.
Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin.
J Biol Chem. 1997a, 272(25):15583-15586
- Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T.
Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase.
J Biol Chem. 1997b, 272(41):25907-25912

Michel T, Feron O.

Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?

J Clin Invest. 1997, 100(9):2146-2152

Michel T.

Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase.

Braz J Med Biol Res. 1999, 32(11):1361-1366

Mitchell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S, de Montellano PR, Kemp BE, Pearson RB.

The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase.

Curr Biol. 1999, 9(15):845-848

Mitchell V, Bouret S, Prevot V, Jennes L, Beauvillain JC.

Evidence for expression of galanin receptor Gal-R1 mRNA in certain gonadotropin releasing hormone neurones of the rostral preoptic area.

J Neuroendocrinol. 1999, 11(10):805-812

Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H.

Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1984, 81(12):3874-3878

Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S, Kimura H.

Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin.

Adv Cyclic Nucleotide Res. 1978, 9:145-158

-N-

Nakane M, Mitchell J, Forstermann U, Murad F.

Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase.

Biochem Biophys Res Commun. 1991, 180(3):1396-1402

Nathan C, Xie QW.

Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls.

Cell. 1994, 78(6):915-918

Negro-Vilar A, Conte D, Valenca M.

Transmembrane signals mediating neural peptide secretion: role of protein kinase C activators and arachidonic acid metabolites in luteinizing hormone-releasing hormone secretion.

Endocrinology. 1986, 119(6):2796-2802

Nikolarakis KE, Almeida OF, Herz A.

Corticotropin-releasing factor (CRF) inhibits gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release superfused rat hypothalamus in vitro.

Brain Res. 1986, 377(2):388-390

Nikolarakis KE, Loeffler JP, Almeida OF, Herz A.
Pre- and postsynaptic actions of GABA on the release of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH).
Brain Res Bull. 1988, 21(4):677-683

Nunez L, Villalobos C, Boockfor FR, Frawley LS.
The relationship between pulsatile secretion and calcium dynamics in single, living gonadotropin-releasing hormone neurons.
Endocrinology. 2000, 141(6):2012-2017

Nylen A, Skagerberg G, Alm P, Larsson B, Holmqvist B, Andersson KE.
Nitric oxide synthase in the hypothalamic paraventricular nucleus of the female rat; organization of spinal projections and coexistence with oxytocin or vasopressin.
Brain Res. 2001, 908(1):10-24

-O-

Ohkuma S, Katsura M, Guo JL, Hasegawa T, Kuriyama K.
Involvement of peroxynitrite in N-methyl-D-aspartate- and sodium nitroprusside-induced release of acetylcholine from mouse cerebral cortical neurons.
Brain Res Mol Brain Res. 1995, 31(1-2):185-193

Ohkuma S, Katsura M, Guo JL, Hasegawa T, Kuriyama K.
Participation of peroxynitrite in acetylcholine release induced by nitric oxide generators.
Neurosci Lett. 1995, 183(3):151-154

Ohkuma S, Katsura M, Guo JL, Narihara H, Hasegawa T, Kuriyama K.
Role of peroxynitrite in [³H] gamma-aminobutyric acid release evoked by nitric oxide and its mechanism.
Eur J Pharmacol. 1996, 301(1-3):179-188

Ohkuma S, Katsura M.
Nitric oxide and peroxynitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CNS.
Prog Neurobiol. 2001, 64(1):97-108

Ohtaki T, Kumano S, Ishibashi Y, Ogi K, Matsui H, Harada M, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M.
Isolation and cDNA cloning of a novel galanin-like peptide (GALP) from porcine hypothalamus.
J Biol Chem. 1999, 274(52):37041-37045

Ojeda SR, Negro-Vilar A, McCann SM.
Release of prostaglandin E₂ by hypothalamic tissue: evidence for their involvement in catecholamine-induced luteinizing hormone-releasing hormone release.
Endocrinology. 1979, 104(3):617-624

Ojeda SR, Negro-Vilar A, McCann SM.

Evidence for involvement of alpha-adrenergic receptors in norepinephrine-induced prostaglandin E2 and luteinizing hormone-releasing hormone release from the median eminence.

Endocrinology. 1982, 110(2):409-412

Ojeda SR, Urbanski HF, Katz KH, Costa ME.

Stimulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production enhances hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release without increasing prostaglandin E2 synthesis: studies in prepubertal female rats.

Endocrinology. 1985, 117(3):1175-1178

Ojeda SR, Negro-Vilar A.

Prostaglandin E2-induced luteinizing hormone-releasing hormone release involves mobilization of intracellular Ca²⁺.

Endocrinology. 1985, 116(5):1763-1770

Ojeda SR, Urbanski HF, Katz KH, Costa ME, Conn PM.

Activation of two different but complementary biochemical pathways stimulates release of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1986, 83(13):4932-4936

Ojeda SR, Urbanski HF, Costa ME, Hill DF, Moholt-Siebert M.

Involvement of transforming growth factor alpha in the release of luteinizing hormone-releasing hormone from the developing female hypothalamus.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1990, 87(24):9698-9702

Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP.

Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane.

J Biol Chem. 1998, 273(10):5419-5422

Olson LM, Jones-Burton CM, Jablonka-Shariff A.

Nitric oxide decreases estradiol synthesis of rat luteinized ovarian cells: possible role for nitric oxide in functional luteal regression.

Endocrinology. 1996, 137(8):3531-3539

-P-

Pai TG, Payne WJ, LeGall J.

Use of a chemiluminescence detector for quantitation of nitric oxide produced in assays of denitrifying enzymes.

Anal Biochem. 1987, 166(1):150-157

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S.

Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.

Nature. 1987, 327(6122):524-526

- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S.
Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine.
Nature. 1988, 333(6174):664-666
- Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC.
Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells.
J Clin Invest. 1997, 100(12):3131-3139
- Park OK, Ramirez VD.
Spontaneous changes in LHRH release during the rat estrous cycle, as measured with repetitive push-pull perfusions of the pituitary gland in the same female rats.
Neuroendocrinology. 1989, 50(1):66-72
- Parton RG.
Caveolae and caveolins.
Curr Opin Cell Biol. 1996, 8(4):542-548
- Pau KY, Berris M, Hess DL, Spies HG.
Proovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in ovarian-intact rhesus macaques.
Endocrinology. 1993, 133(4):1650-1656
- Pelligrino DA, Ye S, Tan F, Santizo RA, Feinstein DL, Wang Q.
Nitric oxide dependent pial arteriolar dilation in the female rat : effect of chronic estrogen depletion and repletion.
Biochem Biophys Res Commun. 2000, 269:165-171
- Peng C, Chang JP, Yu KL, Wong AO, Van Goor F, Peter RE, Rivier JE.
Neuropeptide-Y stimulates growth hormone and gonadotropin-II secretion in the goldfish pituitary: involvement of both presynaptic and pituitary cell actions.
Endocrinology. 1993, 132(4):1820-1829
- Ping L, Mahesh VB, Brann DW.
A physiological role for N-methyl-D-aspartic acid and non-N-methyl-D-aspartic acid receptors in pulsatile gonadotropin secretion in the adult female rat.
Endocrinology. 1994, 135(1):113-118
- Pitts GR, Nunemaker CS, Moenter SM.
Cycles of transcription and translation do not comprise the gonadotropin-releasing hormone pulse generator in GT1 cells.
Endocrinology. 2001, 142(5):1858-1864.
- Fallock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F.
Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991, 88(23):10480-10484

- Poppa V, Miyashiro JK, Corson MA, Berk BC.
Endothelial NO synthase is increased in regenerating endothelium after denuding injury of the rat aorta.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998, 18(8):1312-1321
- Prast H, Philippu A.
Nitric oxide releases acetylcholine in the basal forebrain.
Eur J Pharmacol. 1992, 216(1):139-140
- Prast H, Fischer H, Werner E, Werner-Felmayer G, Philippu A.
Nitric oxide modulates the release of acetylcholine in the ventral striatum of the freely moving rat.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1995, 352(1):67-73
- Prast H, Tran MH, Fischer H, Philippu A.
Nitric oxide-induced release of acetylcholine in the nucleus accumbens: role of cyclic GMP, glutamate, and GABA.
J Neurochem. 1998, 71(1):266-273
- Pratt PF, Nithipatikom K, Campbell WB.
Simultaneous determination of nitrate and nitrite in biological samples by multichannel flow injection analysis.
Anal Biochem. 1995, 231(2):383-386
- 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. 1998a, 84(1):177-191
- Prevot V, Rialas CM, Croix D, Salzet M, Dupouy JP, Poulain P, Beauvillain JC, Stefano GB.
Morphine and anandamide coupling to nitric oxide stimulates GnRH and CRF release from rat median eminence: neurovascular regulation.
Brain Res. 1998b, 790(1-2):236-244
- Prevot V, Croix D, Bouret S, Dutoit S, Tramu G, Stefano GB, Beauvillain JC.
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. 1999a, 94(3):809-819
- Prevot V, Croix D, Rialas CM, Poulain P, Fricchione GL, Stefano GB, Beauvillain JC.
Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat median eminence via a membrane receptor.
Endocrinology. 1999b, 140(2):652-659
- Prevot V, Bouret S, Croix D, Alonso G, Jennes L, Mitchell V, Routtenberg A, Beauvillain JC.
Growth-associated protein-43 messenger ribonucleic acid expression in gonadotropin-releasing hormone neurons during the rat estrous cycle.
Endocrinology. 2000a, 141(5):1648-1657

Prevot V, Bouret S, Stefano GB, Beauvillain J.
Median eminence nitric oxide signaling.
Brain Res Rev. 2000b, 34(1-2):27-41

Prevot V, Bouret S, Croix D, Takumi T, Jennes L, Mitchell V, Beauvillain JC.
Evidence that members of the TGFbeta superfamily play a role in regulation of the GnRH neuroendocrine axis: expression of a type I serine-threonine kinase receptor for TGFbeta and activin in GnRH neurones and hypothalamic areas of the female rat.
J Neuroendocrinol. 2000c, 12(7):665-670

Pu S, Xu B, Kalra SP, Kalra PS.
Evidence that gonadal steroids modulate nitric oxide efflux in the medial preoptic area: effects of N-methyl-D-aspartate and correlation with luteinizing hormone secretion.
Endocrinology. 1996, 137(5):1949-1955

Pu S, Kalra PS, Kalra SP.
Diurnal rhythm in cyclic GMP/nitric oxide efflux in the medial preoptic area of male rats.
Brain Res. 1998, 808(2):310-312

-Q-

-R-

Raber J, Koob GF, Bloom FE.
Interleukin-2 (IL-2) induces corticotropin-releasing factor (CRF) release from the amygdala and involves a nitric oxide-mediated signaling; comparison with the hypothalamic response.
J Pharmacol Exp Ther. 1995, 272(2):815-824

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S.
Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway.
Trends Pharmacol Sci. 1991, 12(3):87-88

Ramsell KD, Cobbett P.
Nitric oxide induces morphological changes in cultured neurohypophysial astrocytes.
J Neuroendocrinol. 1996, 8(3):235-240

Rapoport RM, Murad F.
Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through eGMP.
Circ Res. 1983, 52(3):352-357

Rasmussen DD.
Episodic gonadotropin-releasing hormone release from the rat isolated median eminence in vitro.
Neuroendocrinology. 1993, 58(5):511-518

- Raz A, Wyche A, Fu J, Seibert K, Needleman P.
Regulation of prostanoids synthesis in human fibroblasts and human blood monocytes by interleukin-1, endotoxin, and glucocorticoids.
Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res. 1990, 20:22-27
- Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S.
Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo.
Br J Pharmacol. 1990, 101(3):746-752
- Resh MD.
Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter.
Cell. 1994, 76(3):411-413
- Rettori V, Gimeno M, Lyson K, McCann SM.
Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E2 release from the hypothalamus.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992, 89(23):11543-11546
- 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, 90(21):10130-10134
- Rettori V, Kamat A, McCann SM.
Nitric oxide mediates the stimulation of luteinizing-hormone releasing hormone release induced by glutamic acid in vitro.
Brain Res Bull. 1994, 33(5):501-503
- Rivest S, Rivier C
Central mechanisms and sites of action involved in the inhibitory effects of CRF and cytokines on LHRH neuronal activity.
Ann N Y Acad Sci. 1993a, 697:117-141
- Rivest S, Rivier C
Centrally injected interleukin-1 beta inhibits the hypothalamic LHRH secretion and circulating LH levels via prostaglandins in rats.
J Neuroendocrinol. 1993b, 5(4):445-450
- Rivest S, Lee S, Attardi B, Rivier C.
The chronic intracerebroventricular infusion of interleukin-1 beta alters the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of cycling rats. I. Effect on LHRH and gonadotropin biosynthesis and secretion.
Endocrinology. 1993, 133(6):2424-2430
- Robinson LJ, Busconi L, Michel T.
Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase.
J Biol Chem. 1995, 270(3):995-998

Rochdi L, Theraulaz L, Enjalbert A, Gautron JP. [hydroxyproline]GnRH from the rat hypothalamus during postnatal development.
J Neuroendocrinol. 2000, 12(9):919-926

Rokaeus A, Melander T, Hokfelt T, Lundberg JM, Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V.
A galanin-like peptide in the central nervous system and intestine of the rat.
Neurosci Lett. 1984, 47(2):161-166

Rotsztein WH, Charli JL, Pattou E, Kordon C.
Stimulation by dopamine of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) release from the mediobasal hypothalamus in male rats.
Endocrinology. 1977, 101(5):1475-1483

-S-

Sabatino FD, Collins P, McDonald JK.
Investigation of the effects of progesterone on neuropeptide Y-stimulated luteinizing hormone-releasing hormone secretion from the median eminence of ovariectomized and estrogen-treated rats.
Neuroendocrinology. 1990, 52(6):600-607

Sahu A, Jacobson W, Crowley WR, Kalra SP.
Dynamic changes in neuropeptide Y concentrations in the median eminence in association with preovulatory luteinizing hormone release in the rat.
J Neuroendocrinol. 1989, 1(2): 83-87.

Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P.
Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993, 90(15):7240-7244

Salzman AL, Linn SC, Szabo C.
Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase mRNA expression in human intestinal epithelial cells.
Int J Mol Med. 2000, 6(2):209-216

Sarkar DK, Chiappa SA, Fink G, Sherwood NM.
Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats.
Nature. 1976, 264(5585):461-463

Sarkar DK, Fink G.
Gonadotropin-releasing hormone surge: possible modulation through postsynaptic alpha-adrenoreceptors and two pharmacologically distinct dopamine receptors.
Endocrinology. 1981, 108(3):862-867.

Sarkar DK, Minami S.
Diurnal variation in luteinizing hormone-releasing hormone and beta-endorphin release in pituitary portal plasma during the rat estrous cycle.
Biol Reprod. 1995, 53(1):38-45

- Satoh S, Murayama T, Nomura Y.
Sodium nitroprusside stimulates noradrenaline release from rat hippocampal slices in the presence of dithiothreitol.
Brain Res. 1996a, 733(2):167-174
- Satoh S, Kimura T, Toda M, Miyazaki H, Ono S, Narita H, Murayama T, Nomura Y.
NO donors stimulate noradrenaline release from rat hippocampus in a calmodulin-dependent manner in the presence of L-cysteine.
J Cell Physiol. 1996b, 169(1):87-96
- Schally AV, Nair RM, Redding TW, Arimura A.
Isolation of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone-releasing hormone from porcine hypothalamus.
J Biol Chem. 1971, 246(23):7230-7236
- Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Gorsky LD, Forstermann U, Murad F.
Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991, 88(2):365-369
- Schuman EM, Madison DV.
Nitric oxide and synaptic function.
Annu Rev Neurosci. 1994, 17:153-183
- Seeburg PH, Adelman JP.
Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone.
Nature. 1984, 311(5987):666-668
- Segieth J, Getting SJ, Biggs CS, Whitton PS.
Nitric oxide regulates excitatory amino acid release in a biphasic manner in freely moving rats.
Neurosci Lett. 1995, 200(2):101-104
- Segovia G, Porras A, Mora F.
Effects of a nitric oxide donor on glutamate and GABA release in striatum and hippocampus of the conscious rat.
Neuroreport. 1994, 5(15):1937-1940
- Seilicovich A, Duvilanski BH, Pisera D, Theas S, Gimeno M, Rettori V, McCann SM.
Nitric oxide inhibits hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release by releasing gamma-aminobutyric acid.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995, 92(8):3421-3424
- Selmanoff MK, Wise PM, Barraclough CA.
Regional distribution of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in rat brain determined by microdissection and radioimmunoassay.
Brain Res. 1980, 192(2):421-432
- Shaul PW, Anderson RG.
Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction.
Am J Physiol. 1998, 275(5 Pt 1):L843-51

Shen ES, Meade EH, Perez MC, Deccher DC, Negro-Vilar A, Lopez FJ.
Expression of functional estrogen receptors and galanin messenger ribonucleic acid in immortalized luteinizing hormone-releasing hormone neurons: estrogenic control of galanin gene expression.
Endocrinology. 1998, 139(3):939-948

Shibuki K, Okada D.
Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum.
Nature. 1991, 349(6307):326-328

Shikano K, Long CJ, Ohlstein EH, Berkowitz BA.
Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide.
J Pharmacol Exp Ther. 1988, 247(3):873-881

Seilicovich A, Duvilanski BH, Pisera D, Thoas S, Girano M, Rettori V, McCann SM.
Nitric oxide inhibits hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release by releasing gamma-aminobutyric acid.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995, 92(8):3421-3424

Silverman AJ, Jhamandas J, Renaud LP.
Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence.
J Neurosci. 1987, 7(8):2312-2319

Smith MS, Freeman ME, Neill JD.
The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy.
Endocrinology 1975, 96(1):219-226

Spergel DJ, Catt KJ, Rojas E.
Immortalized GnRH neurons express large-conductance calcium-activated potassium channels.
Neuroendocrinology. 1996, 63(2):101-111

Stadler J, Harbrecht BG, Di Silvio M, Curran RD, Jordan ML, Simmons RL, Billiar TR.
Endogenous nitric oxide inhibits the synthesis of cyclooxygenase products and interleukin-6 by rat Kupffer cells.
J Leukoc Biol. 1993, 53(2):165-172

Stasek JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schroder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub A, Schramm M
NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase.
Nature. 2001, 410(6825):212-215

Steiner RA, Bremner WJ, Clifton DK.
Regulation of luteinizing hormone pulse frequency and amplitude by testosterone in the adult male rat.
Endocrinology. 1982, 111(6):2055-2061

Stevens-Truss R, Marletta MA.

Interaction of calmodulin with the inducible murine macrophage nitric oxide synthase.
Biochemistry. 1995, 34(48):15638-15645

Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF.

Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991, 88(17):7773-7777

Strijbos PJ.

Nitric oxide in cerebral ischemic neurodegeneration and excitotoxicity.
Crit Rev Neurobiol. 1998, 12(3):223-243

Summy-Long JY, Bui V, Mantz S, Foejler E, Weisz J, Kadakaro M.

Central inhibition of nitric oxide synthase preferentially augments release of oxytocin during dehydration.
Neurosci Lett. 1993, 152(1-2):190-193

Suter KJ, Wuarin JP, Smith BN, Dudek FE, Moenter SM.

Whole-cell recordings from preoptic/hypothalamic slices reveal burst firing in gonadotropin-releasing hormone neurons identified with green fluorescent protein in transgenic mice.
Endocrinology. 2000, 141(10):3731-3736

Sutton SW, Toyama TT, Otto S, Plotsky PM.

Evidence that neuropeptide Y (NPY) released into the hypophysial-portal circulation participates in priming gonadotropes to the effects of gonadotropin releasing hormone (GnRH).
Endocrinology. 1988, 123(2):1208-1210

-T-

Tatemoto K, Rokaeus A, Jornvall H, McDonald TJ, Mutt V.

Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine.
FEBS Lett. 1983, 164(1):124-128

Terasawa E.

Cellular mechanism of pulsatile LHRH release.
Gen Comp Endocrinol. 1998, 112(3):283-295

Terasawa E, Keen KL, Mogi K, Claude P.

Pulsatile release of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in cultured LHRH neurons derived from the embryonic olfactory placode of the rhesus monkey.
Endocrinology. 1999a, 140(3):1432-1441

Terasawa E, Sehanhofer WK, Keen KL, Luchansky L.

Intracellular Ca²⁺ oscillations in luteinizing hormone-releasing hormone neurons derived from the embryonic olfactory placode of the rhesus monkey.
J Neurosci. 1999b, 19(14):5898-5909

Terasawa E.

Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons: mechanism of pulsatile LHRH release.

Vitam Horm. 2001, 63:91-129

Tomita T, Tsuyama S, Imai Y, Kitagawa T.

Purification of bovine soluble guanylate cyclase and ADP-ribosylation on its small subunit by bacterial toxins.

J Biochem (Tokyo). 1997, 122(3):531-536

-U-

-V-

Van Goor F, LeBeau AP, Krstanovic LZ, Sherman A, Catt KJ, Stojilkovic SS.

Amplitude-dependent spike-broadening and enhanced Ca(2+) signaling in GnRH-secreting neurons.

Biophys J. 2000, 79(3):1310-1323

Vazquez-Martinez R, Shorte SL, Boockfor FR, Frawley LS.

Synchronized exocytotic bursts from gonadotropin-releasing hormone-expressing cells: dual control by intrinsic cellular pulsatility and gap junctional communication.

Endocrinology. 2001, 142(5):2095-2101

Vernet D, Bonavera JJ, Swerdloff RS, Gonzalez-Cadavid NF, Wang C.

Spontaneous expression of inducible nitric oxide synthase in the hypothalamus and other brain of aging rats.

Endocrinology. 1998, 139(7):3254-3261

-W-

Walter U.

Physiological role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system.

Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1989, 113:41-88

Wang Y, Marsden PA.

Nitric oxide synthases: gene structure and regulation.

Adv Pharmacol. 1995, 34:71-90

Wehrenberg WB, Corder R, Gaillard RC.

A physiological role for neuropeptide Y in regulating the estrogen/progesterone induced luteinizing hormone surge in ovariectomized rats.

Neuroendocrinology. 1989, 49(6):680-682

Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S.

Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1994, 91(11):5212-5216

Wetsel WC, Valenca MM, Merchenthaler I, Liposits Z, Lopez FJ, Weiner RI, Mellon PL, Negro-Vilar A.

Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone-secreting neurons.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1992, 89(9):4149-53

Wetsel WC.

Immortalized hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons: a new tool for dissecting the molecular and cellular basis of LHRH physiology.

Cell Mol Neurobiol. 1995, 15(1):43-78

White AA, Aurbach GD.

Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues.

Biochim Biophys Acta. 1969, 191(3):686-697

Wink DA, Mitchell JB.

Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide.

Free Radic Biol Med. 1998, 25(4-5):434-456

Wood J, Garthwaite J.

Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties.

Neuropharmacology. 1994, 33(11):1235-1244.

Wray S, Hoffman GE.

Organization and interrelationship of neuropeptides in the central amygdaloid nucleus of the rat.

Peptides. 1983, 4(4):525-541

-X-

Xia L, Van Vugt D, Alston EJ, Luckhaus J, Ferin M.

A surge of gonadotropin-releasing hormone accompanies the estradiol-induced gonadotropin surge in the rhesus monkey.

Endocrinology. 1992, 131(6):2812-2820

Xu W, Gorman P, Sheer D, Bates G, Kishimoto J, Lizhi L, Emson P.

Regional localization of the gene coding for human brain nitric oxide synthase (NOS1) to 12q24.2-->24.31 by fluorescent in situ hybridization.

Cytogenet Cell Genet. 1993, 64(1):62-63

Xu M, Urban JH, Hill JW, Levine JE.

Regulation of hypothalamic neuropeptide Y Y1 receptor gene expression during the estrous cycle: role of progesterone receptors.

Endocrinology. 2000, 141(9):3319-3327

-Y-

Yamada K, Emson P, Hokfelt T.

Immunohistochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat hypothalamus and colocalization with neuropeptides.

J Chem Neuroanat. 1996, 10(3-4):295-316

Yasin S, Costa A, Trainer P, Windle R, Forsling ML, Grossman A.

Nitric oxide modulates the release of vasopressin from rat hypothalamic explants.

Endocrinology. 1993, 133(3):1466-1469

Yokoo H, Schlesinger DH, Goldstein M.

The effect of neuropeptide Y (NPY) on stimulation-evoked release of [3H]norepinephrine (NE) from rat hypothalamic and cerebral cortical slices.

Eur J Pharmacol. 1987, 143(2):283-286

You J, Edvinsson L, Bryan RM Jr.

Neuropeptide Y-mediated constriction and dilation in rat middle cerebral arteries.

J Cereb Blood Flow Metab. 2001, 21(1):77-84

Yu WH, Kimura M, Walezewska A, Karanth S, McCann SM.

Role of leptin in hypothalamic-pituitary function.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1997a, 94(3):1023-1028

Yu WH, Walezewska A, Karanth S, McCann SM.

Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland.

Endocrinology. 1997b, 138(11):5055-5058

-Z-

Zagotta WN, Siegelbaum SA.

Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels.

Annu Rev Neurosci. 1996, 19:235-263

Zhu XZ, Luo LG.

Effect of nitroprusside (nitric oxide) on endogenous dopamine release from rat striatal slices.

J Neurochem. 1992, 59(3):932-935

Zoche M, Beyermann M, Koch KW.

Introduction of a phosphate at serine741 of the calmodulin-binding domain of the neuronal nitric oxide synthase (NOS-I) prevents binding of calmodulin.

J Biol Chem. 1997, 272(8):851-857



FIN

