

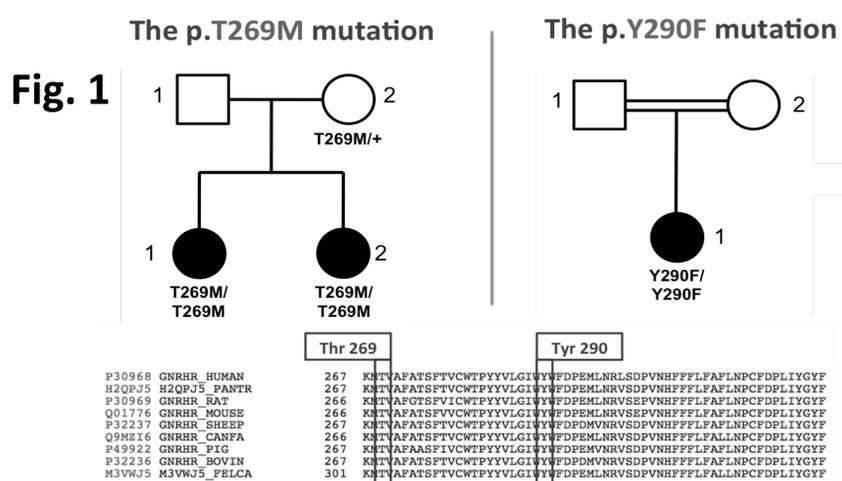
Identification et caractérisation moléculaire de deux nouvelles mutations de GNRHR chez deux familles avec retard pubertaire

Luigi Maione^{a,c}, Jérôme Bouligand^b, Immacolata C. Nettore^c, Colleen Flanagan^d, Anne Guiochon-Mantel^b, Robert P. Millar^e, Paolo E. Macchia^c, Jacques Young^a

^a Service d'Endocrinologie et Maladies de la Reproduction, Université Paris Sud et Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre, FRANCE ; ^b Laboratoire de Génétique moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre, FRANCE ; ^c Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Sezione di Endocrinologia, Università degli Studi di Napoli Federico II, Naples, ITALIE ; ^d School of Physiology, University of the Witwatersrand Faculty of Health Sciences, Johannesburg, AFRIQUE DU SUD ; ^e UCT/MRC Receptor Biology Research Unit, Institute of Infectious Diseases and Molecular Medicine, University of Cape Town Medical School, Cape Town, AFRIQUE DU SUD

Contexte: La puberté humaine est déclenchée par la GnRH à travers l'activation de son récepteur spécifique GnRHR.

Objectif: Caractériser, *in silico* et *in vitro*, deux mutations originales de *GNRHR* retrouvées chez des adolescentes avec retard pubertaire et gonadotrophines basses.

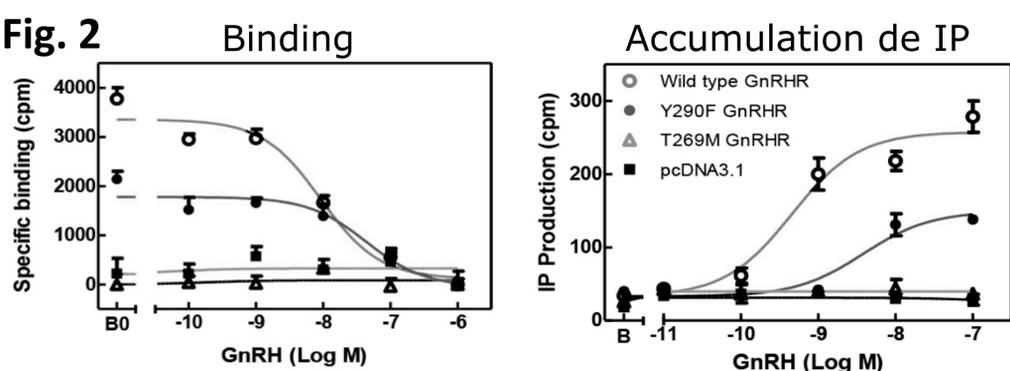


Patients et Méthodes. Les analyses génétiques familiales ont permis de retrouver chez les patientes les mutants homozygotes originaux c. 806C>T (p.T269M) et c.869A>T (p.Y290F).

La mutation T269M est portée par deux soeurs à l'état homozygote (Fig. 1). La mutation Y290F est portée par une fille avec RP issue de parents consanguins à l'état homozygote. Les deux acide aminés sont conservés chez les mammifères.

L'étude de binding a été conduit à l'aide d'un ligand radiomarqué GnRH-¹²⁵I. La voie calcique a été explorée par accumulation de inositol phosphate (IP), alors que la voie des MAPK à travers l'expression de luciférase couplée aux éléments de réponse au sérum (SRE-Luc) et par Western Blots des phosphorylations cible. L'analyse d'expression membranaire a été réalisée par une approche de construct des GNRHRs couplés à une séquence flag et détection du signal flag sur les extraits cellulaires membranaires.

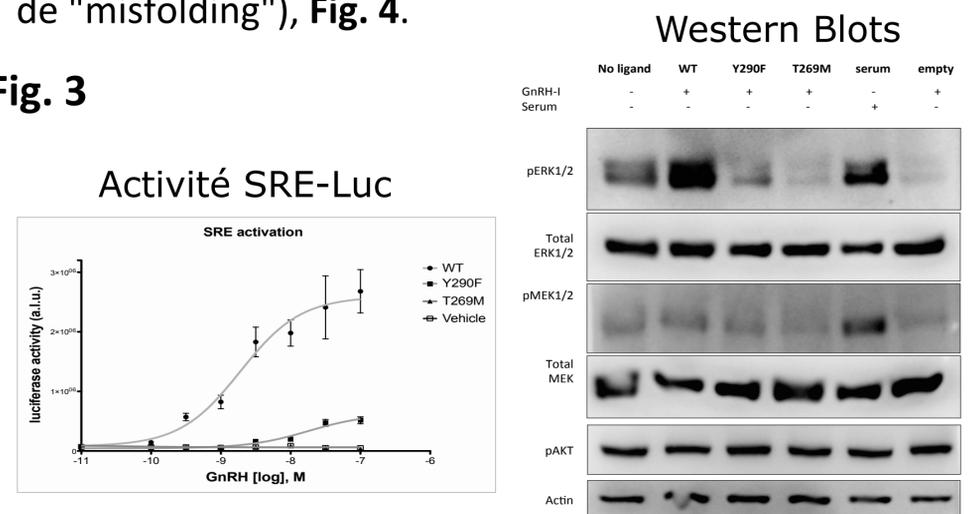
Résultats: Les analyses «in silico» par les logiciels de prédiction fonctionnelle SIFT et PolyPhen-2 indiquaient un probable effet délétère avec perte de fonction. Une analyse fonctionnelle *in vitro* des 2 mutants a été réalisée.



Le récepteur T269M présente une perturbation majeure de liaison au GnRHR et il était incapable d'activer accumulation d'inositol phosphate (IP, Fig. 2)

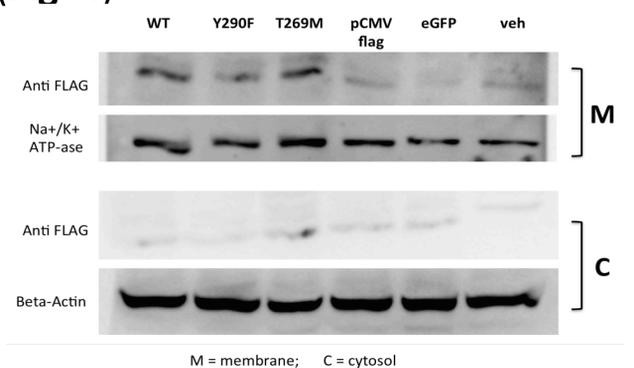
De plus, après transfection transitoire avec GnRHR T269M, la stimulation par la GnRH était incapable d'activer SRE-Luc ainsi que la phosphorylation de ERK1/2 (Fig. 3). L'étude de localisation subcellulaire du récepteur muté T269M a montré qu'il était capable d'être adressé normalement à la surface cellulaire (pas de "misfolding"), Fig. 4.

Fig. 3



Concernant le deuxième mutant Y290F, la stimulation par la GnRH montrait une certaine réponse en termes de signalisation aussi bien que d'accumulation de IP (Fig. 2). Il était capable d'induire une faible activation de SRE-Luc et la phosphorylation de ERK1/2 (Fig. 3). Une réduction de la liaison de la GnRH au récepteur Y290F a aussi été retrouvée (Fig. 2). Le récepteur Y290F était aussi correctement adressé à la membrane (Fig. 4).

Fig. 4



En conclusion, les deux mutations homozygotes de *GNRHR* T269M et Y290F, en accord avec leur modalité de transmission, ont été démontrées délétères du point de vue moléculaire, et sont donc bien responsables du phénotype observé dans ces 2 familles avec retard pubertaire.