

Structure et relations structure-activité des hormones folliculo-stimulantes recombinantes humaines

Yves Combarrous

Les hormones glycoprotéiques, dont font partie les gonadotrophines, sont les molécules les plus complexes possédant une activité hormonale. Elles sont constituées de deux sous-unités différentes, α et β , liées de manière non covalente et portant, chacune, une ou plusieurs chaînes oligosaccharidiques. L'activité biologique globale des gonadotrophines est dépendante de leur efficacité lors de trois étapes successives : (1) leur maintien plus ou moins long dans la circulation ; (2) leur affinité pour leur récepteur spécifique ; et (3) leur aptitude à stimuler les réponses de leurs cellules cibles après liaison au récepteur. Les gonadotrophines recombinantes ne peuvent être produites dans des bactéries mais seulement dans des cellules eucaryotes. La seule voie d'amélioration à court terme de la qualité des FSH recombinantes semble être l'augmentation de leur demi-vie et la diminution de leur polymorphisme par l'obtention de chaînes saccharidiques tri- ou tétra-antennées et leur sialylation la plus complète possible.

Les gonadotrophines hypophysaires exercent un rôle central dans le contrôle de la reproduction de tous les vertébrés, tant chez les mâles que chez les femelles. Chez les vertébrés supérieurs, ces gonadotrophines hypophysaires sont l'hormone lutéinisante ou lutropine (LH) et l'hormone folliculo-stimulante ou follitropine (FSH). Chez les primates, comme chez les équidés, il existe en outre une troisième gonadotrophine, sécrétée par le placenta et dénom-

mée choriogonadotrophine (hCG dans l'espèce humaine). Les gonadotrophines appartiennent, avec l'hormone thyroestimulante (TSH), à la famille des hormones glycoprotéiques constituées de deux sous-unités différentes, α et β , associées de manière non covalente.

Les chaînes oligosaccharidiques des hormones glycoprotéiques étant indispensables à leur activité biologique, les gonadotrophines recombinantes ne peuvent être produites dans des bactéries mais seulement

ADRESSE

Y. Combarrous : directeur de recherche au Cnrs, directeur de l'URA Cnrs 1291. Inra, Centre de recherches de Tours, 37380 Nouzilly, France.

dans des cellules eucaryotes. A l'inverse des sous-unités de l'insuline, les sous-unités α et β des hormones glycoprotéiques sont codées par deux gènes différents et la production séparée des sous-unités recombinantes ne permet pas, ensuite, leur réassociation. L'association des chaînes polypeptidiques α et β a en effet lieu très tôt au cours de la biosynthèse dans le réticulum endoplasmique et détermine ensuite la maturation correcte des dimères et de leurs chaînes saccharidiques. Les vecteurs d'expression pour les deux sous-unités doivent donc impérativement être co-transfectés pour permettre la biosynthèse de gonadotrophines recombinantes fonctionnelles. Les types cellulaires utilisés sont généralement des cellules de mammifères telles que les cellules CHO (lignée ovarienne de hamster chinois) ou les cellules COS (lignée rénale de singe vert), mais également des cellules d'insectes telles que les cellules Sf9 ou la levure *Pichia pastoris*. Pour les cellules CHO et COS, on utilise divers vecteurs plasmidiques *ad hoc* transfectés par les techniques classiques (précipitation ADN-phosphate de calcium, électroporation); pour les cellules Sf9, on utilise l'infection par un baculovirus recombinant dans lequel on place les séquences codantes des sous-unités sous le contrôle de deux copies en sens inverses du promoteur de p10; pour *P. pastoris*, on place ces séquences sous le contrôle de deux copies du promoteur du gène de l'alcool oxydase 1 de la levure.

Structure des FSH humaines recombinantes

Les hormones glycoprotéiques, dont font partie les gonadotrophines, sont les molécules les plus complexes parmi celles qui possèdent une activité hormonale. Elles sont constituées de deux sous-unités différentes, α et β , liées de manière non covalente et portent, chacune, une ou plusieurs chaînes oligosaccharidiques. La séquence de la sous-unité α humaine, commune aux quatre hormones glycoprotéiques de l'espèce, est décrite sur la *figure 1*. Cette sous-unité comporte seulement 92 résidus d'acides aminés au lieu de 96 résidus chez tous les non-primates et l'apparie-

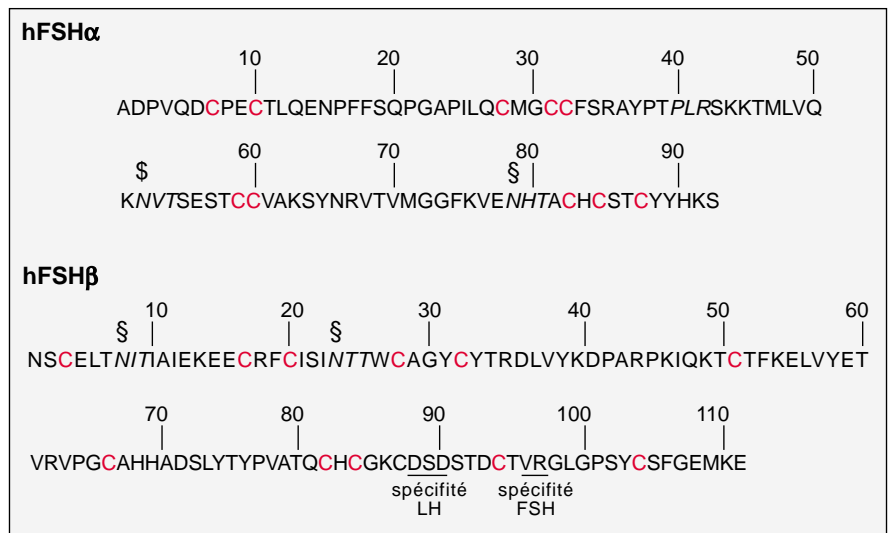


Figure 1. **Structure des sous-unités α et β de la hFSH hypophysaire.** Les signes \S indiquent les N-glycanes de type Gal-(NANA); les signes $\$$, les N-glycanes de type GalNAc-(SO4) (voir figure 3). Les acides aminés apparaissant en italiques sont les sites d'aminoglycosylation (NXT) et la séquence de reconnaissance (PLR) de la GalNAc transférase conduisant à la synthèse de chaînes de types GalNAc-SO4 sur le site de glycosylation situé à une dizaine d'acides aminés du côté carboxy-terminal (α Asn52). Les acides aminés soulignés dans la sous-unité hFSH β appartiennent à la « ceinture de sécurité » et sont responsables, respectivement, de l'inhibition de la liaison aux récepteurs LH (ici DSD en positions 88-90 de hFSH β) et de l'inhibition de la liaison aux récepteurs FSH (présence de GP en positions 96-97 de hLH β à la place de VR dans hFSH β). Code à une lettre des acides aminés: A: Ala; C: Cys; D: Asp; E: Glu; F: Phe; G: Gly; H: His; I: Ile; K: Lys; L: Leu; M: Met; N: Asn; P: Pro; Q: Gln; R: Arg; S: Ser; T: Thr; V: Val; W: Trp; Y: tyr.

ment des demi-cystines formant ses cinq ponts disulfures entre les demi-cystines 10-60, 28-82, 32-84, 7-31 et 59-87 est maintenant connu sans ambiguïté grâce à la détermination de la structure tridimensionnelle de hCG par cristallographie aux rayons X [1, 2]. L'arrangement des ponts 10-60, 28-82, 32-84 permet, sur le plan structural, de classer la sous-unité α dans la superfamille des facteurs de croissance à nœud de cystines (TGF β 2, PDGF, NGF). La *figure 1* présente également la séquence d'acides aminés de la sous-unité β de la FSH humaine. La sous-unité β est spécifique et confère à la FSH ses propriétés biologiques particulières. Les demi-cystines de la hFSH occupent les mêmes positions que celles de hCG β et ses ponts disulfures sont donc, sans aucun doute, homologues de ceux déterminés pour hCG β par cristallographie aux rayons X, c'est-à-dire entre les résidus de demi-cystines 3-51, 28-82, 32-84, 17-66, 20-104 et 87-94. Les ponts 3-51, 28-82 et 32-84 formeraient un nœud de cystines semblable à

celui de la sous-unité α . La hFSH β possède deux sites de N-glycosylation sur les Asn 17 et 24.

La structure tridimensionnelle de la hFSH n'a pas encore été déterminée expérimentalement mais peut être modélisée sur la base de celle de la hCG (*figure 2*). Les deux sous-unités présentent une forme très étendue et sont constituées de longues séquences d'acides aminés en feuilletts β antiparallèles. La sous-unité β enserré la sous-unité α par une « ceinture de sécurité » qui est formée des résidus β 87-104 (β 93-110 dans hCG) et qui est « bouclée » par le pont disulfure entre les cystéines β 20 et β 104 (homologues de β 26 et β 110 de hCG). Le potentiel redox du réticulum endoplasmique et l'intervention de protéines chaperonnes, dont la PDI (*protein disulfide interchange*), jouent un rôle important dans la constitution des hétérodimères $\alpha\beta$ des gonadotrophines qui sont ainsi stabilisés [3].

Les sites potentiels de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) des gonadotro-

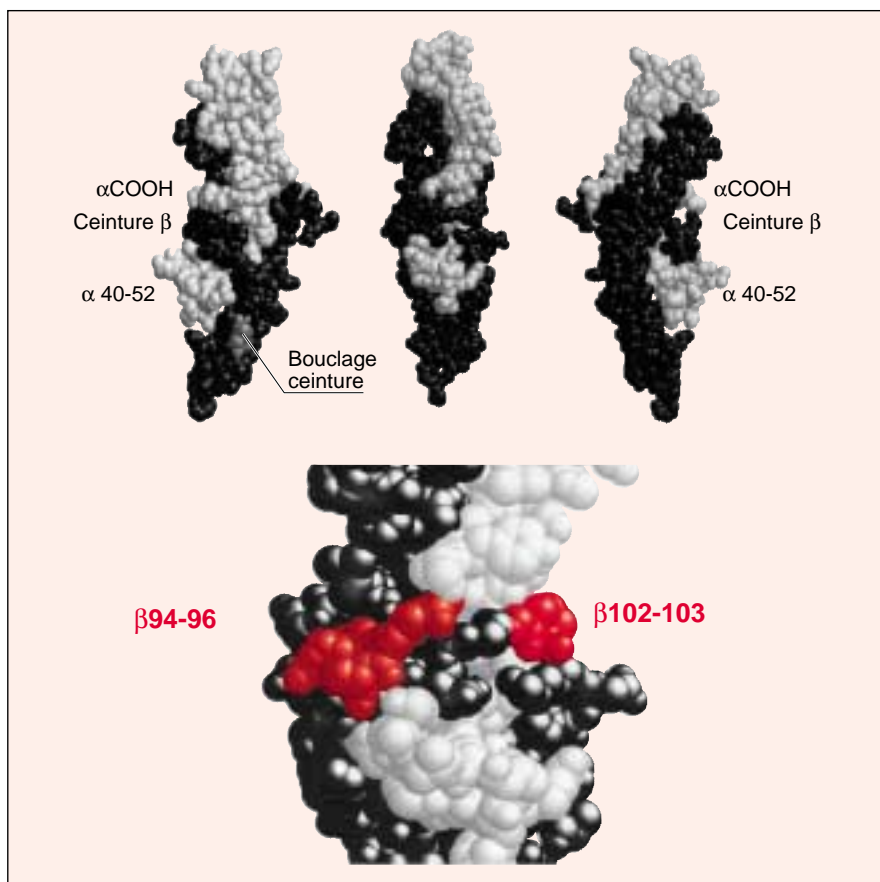


Figure 2. **Structure tridimensionnelle de la choriogonadotrophine humaine (hCG).** A. La figure centrale montre l'hCG « vue de face », c'est-à-dire telle qu'elle se présente à son récepteur. Les parties blanches constituent la sous-unité α et les parties noires, la sous-unité β . Les « profils » gauche et droit de hCG, obtenus par rotation d'un quart de tour dans chaque sens, sont montrés respectivement à gauche et à droite. On distingue bien la « ceinture de sécurité » de β autour de α et deux régions de α (carboxy-terminale et α 40-52) qui lui sont proches et qui interviennent dans la liaison hormone-récepteur. B. Les acides aminés β 94-96 et β 102-103 de hCG (homologues de β 88-90 et β 96-97 de hFSH) appartiennent à la « ceinture de sécurité » et sont impliqués dans la spécificité de liaison des gonadotrophines à leurs récepteurs respectifs (figure 4).

phines sont tous effectivement glycosylés [4]. Les structures principales des chaînes N-saccharidiques des hormones glycoprotéiques sont indiquées sur la figure 3. Toutes ces chaînes possèdent une même structure centrale indiquée en rouge dans la figure 3, composée de deux résidus de N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) et de trois mannoses (Man). Beaucoup de ces chaînes sont bi-antennées comme cela est indiqué sur la figure 3 mais une certaine proportion d'entre elles peut être tri-antennée et plus rarement tétra-antennée. Les résidus saccharidiques terminaux indiqués en noir ne sont présents que dans une

fraction plus ou moins grande des chaînes. La nature de ces résidus terminaux dépend, d'une part, du type cellulaire dans lequel s'effectue la biosynthèse et, d'autre part, de la présence de la séquence Pro-Ala-Arg (PAR β 42-44) à une dizaine de résidus en amont du site de N-glycosylation (site \$) dans la séquence polypeptidique (figure 1). Les cellules hypophysaires sont parmi les très rares types cellulaires qui possèdent une GalNAc-transférase et une sulfo-transférase permettant la synthèse des séquences -GlcNAc4-1 β GalNAc-SO4 à l'extrémité des chaînes saccharidiques. Dans l'espèce humaine, ce

sont essentiellement les chaînes N-saccharidiques portées par l'Asn α 52 des hormones glycoprotéiques qui sont susceptibles de subir l'action de la GalNAc-transférase [5, 6]. Néanmoins, si la séquence terminale GalNAc-SO4 a été mise en évidence dans la sous-unité hLH α , elle ne l'a pas été clairement dans la sous-unité hFSH α . Les terminaisons galactose-acide sialique (Gal-NANA) sont une sorte de « glycosylation standard » avec laquelle la glycosylation particulière de l'hypophyse (GalNAc-SO4) entre en concurrence. De ce fait, il existe également dans la hFSH hypophysaire des structures mixtes au sein desquelles des antennes d'une même chaîne possèdent des terminaisons différentes, Gal-NANA et GalNAc-SO4. Les hormones placentaires ainsi que les hormones recombinantes produites dans les cellules de mammifères présentent uniquement des chaînes de type Gal-NANA.

Il existe une très grande hétérogénéité structurale des chaînes saccharidiques due à la variabilité du nombre et de la longueur des antennes. Cela se traduit par un important polymorphisme de charge puisque l'acide sialique et le groupe sulfate sont tous deux électro-négatifs. Le polymorphisme des chaînes saccharidiques des deux hFSH recombinantes commerciales (Gonal-F $^{\circledR}$, Serono; Puregon $^{\circledR}$, Organon) est très marqué [7, 8]. Leurs sous-unités α portent 85 % d'oligosaccharides di-antennés et 15 % d'oligosaccharides tri-antennés et leurs sous-unités β 75 % de di-antennés et 25 % de tri-antennés tous fucosylés dans une large proportion; en outre, une petite partie des chaînes saccharidiques des sous-unités β portent des enchaînements d'acétyl-lactosamine [8].

La comparaison en chromatofocalisation d'une hFSH urinaire (Metrodin $^{\circledR}$, Serono) et d'une hFSH recombinante indique que les deux préparations présentent des hétérogénéités de charge comparables [9, 10]. En focalisation isoélectrique, les gammes de pI d'une hFSH hypophysaire (FSH HP $^{\circledR}$, Serono) et d'une hFSH recombinante (Gonal-F $^{\circledR}$, Serono) sont respectivement de 3 à 5,5 et de 3,5 à 6,1 [11]. La gamme des pI de la hFSH recombinante apparaît donc légèrement plus basique que celle de la hFSH uri-

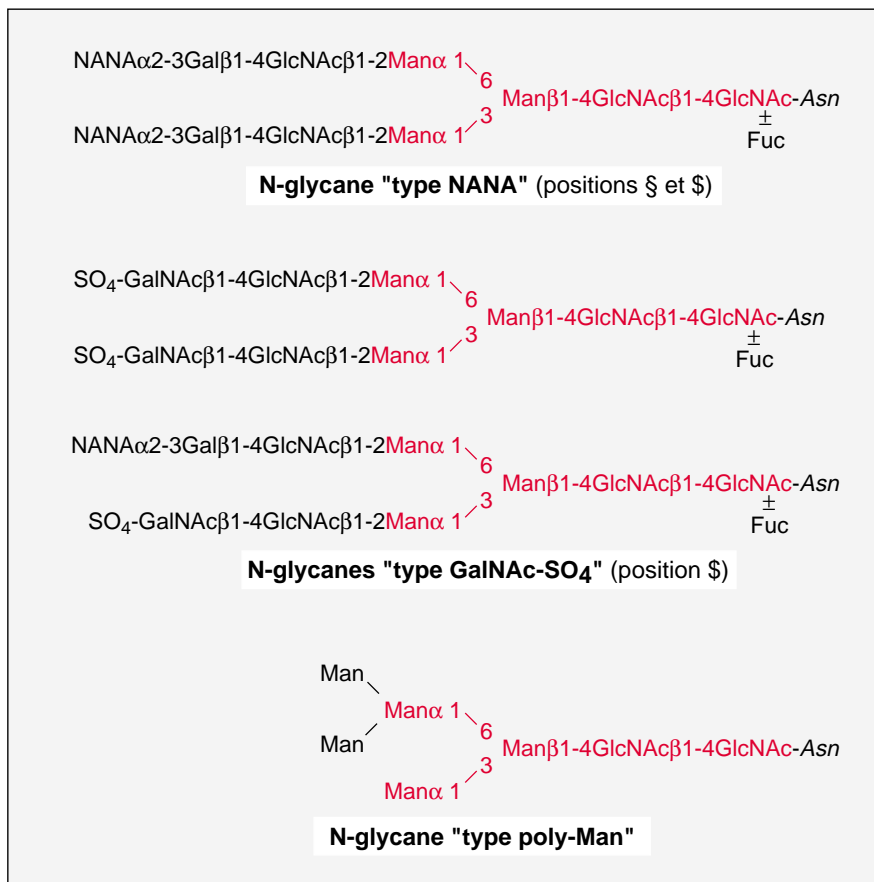


Figure 3. **Structures-types des chaînes N-oligosaccharidiques.** Structures N-oligosaccharidiques : la structure centrale, commune à toutes les chaînes, est indiquée en caractères rouges. Les séquences indiquées en caractères noirs sont plus ou moins complètes donnant lieu à une grande hétérogénéité structurale responsable du polymorphisme important des gonadotrophines. Les glycanes de type « NANA » sont retrouvés sur tous les sites de toutes les hormones hypophysaires ou produites dans les cellules CHO ou COS. Les glycanes de type « GalNAcSO₄ » ne sont trouvés que sur certains sites de glycosylation (§ figure 1) et seulement dans les hormones hypophysaires. Les structures de type « polymannose » sont observées sur les gonadotrophines recombinantes produites par les cellules d'insecte Sf9, par la levure *Pichia pastoris* ainsi que par des cellules CHO défectueuses en N-acétylglycosamine transférase (NAGT-).

naire suggérant que le nombre total de groupements saccharidiques acides (NANA + GalNAc-SO₄ dans la hFSH urinaire; NANA seulement dans la hFSH recombinante) est plus élevé dans la hFSH urinaire. La présence de proportions relatives différentes des isoformes est un problème épineux pour la caractérisation des hFSH recombinantes et leur standardisation. Récemment, une technique de prédiction de l'activité biologique *in vivo* de la hFSH recombinante à partir de son comportement en focalisation isoélectrique quantitative a été proposée [12]. Son degré d'exac-

titude par rapport aux valeurs déterminées en dosage (écart-type relatif de 6 %) permet d'envisager de diminuer le nombre des essais *in vivo* pour ces hormones hautement purifiées. Diverses hFSH mutées ont été produites par mutagenèse dirigée afin d'étudier les relations structure-activité de l'hormone (*voir plus loin*). Outre de nombreuses mutations ponctuelles qui permettent de définir les rôles individuels de résidus d'acides aminés, des mutations plus larges de hFSH ont été réalisées qui nous renseignent sur des propriétés globales de divers domaines de la

molécule. Ainsi, la fusion des deux sous-unités de hFSH en une seule chaîne polypeptidique a été réalisée et permet d'étudier les effets sur l'activité biologique de mutations qui, sur la hFSH sauvage, conduisent à l'inactivation par dissociation des sous-unités. Cette fusion a été réalisée en couplant l'extrémité aminotermine de la sous-unité α à l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité β [13] afin de laisser libre l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité α qui joue un rôle primordial à la fois dans la liaison de hFSH à son récepteur et dans la transduction du signal hormonal [14]. Plus récemment, des mutations ponctuelles X \rightarrow Cys ont été réalisées en positions α 35 (Arg \rightarrow Cys) et β 29 (Ala \rightarrow Cys) ainsi qu'en positions α 37 (Tyr \rightarrow Cys) et β 27 (Trp \rightarrow Cys) permettant l'établissement de ponts disulfures interchaînes α -S-S- β [15]. Ces mutants présentent une activité biologique *in vitro* semblable à celle de la hFSH sauvage mais leur stabilité thermique (65 °C/4 h) est bien meilleure.

La fusion de la région polypeptidique carboxy-terminale (CTP) de la sous-unité β de hCG aux sous-unités α et β de hFSH a également été réalisée en vue de modifier sa demi-vie (*voir plus loin*).

Relations structure-activité

L'activité biologique globale des gonadotrophines est dépendante de leur efficacité lors de trois étapes successives : (1) leur maintien plus ou moins long dans la circulation ; (2) leur affinité pour leur récepteur spécifique ; et (3) leur aptitude à stimuler les réponses de leurs cellules cibles après liaison au récepteur. Nous évoquerons les rôles des différentes structures de la hFSH dans la réalisation de ces trois étapes successives ainsi que les diverses perspectives envisageables de production de molécules folliculo-stimulantes plus efficaces et/ou plus sûres.

Demi-vie dans la circulation

On sait depuis longtemps que les chaînes oligosaccharidiques des gonadotrophines jouent un rôle primordial dans leur demi-vie plasma-

tique. L'élimination des acides sialiques terminaux provoque une chute considérable de ces demi-vies et, par conséquent, des activités *in vivo* des hormones.

Les hFSH recombinantes produites dans les cellules CHO déficientes en sialyl-transférase (ST⁻) ne possèdent jamais les résidus NANA terminaux indiqués sur la figure 3. Celles produites dans les cellules CHO déficientes en N-acétylglucosamine transférase (NAGT⁻) présentent des structures N-saccharidiques de type poly-Man [16] comme les FSH produites dans les cellules Sf9 ou dans la levure *P. pastoris* [17]. Toutes ces FSH recombinantes présentent des activités biologiques *in vitro* semblables aux FSH produites dans les cellules CHO sauvages. Leur faible activité biologique *in vivo* est donc due à leur courte demi-vie dans la circulation par rapport aux hFSH portant des chaînes saccharidiques complètes, incluant leurs acides sialiques terminaux. Les hFSH fonctionnelles *in vivo* n'ont pu être produites que par des lignées cellulaires de mammifères. A ce jour, les deux seules hFSH recombinantes commercialisées (Gonal-F[®], Serono; Puregon[®], Organon) ont toutes été produites dans les cellules CHO [11, 18] et présentent une très forte hétérogénéité de charges. Les rapports d'activités biologiques *in vivo* et immunologiques (B/I) des isoformes de pI 5,49 et 4,27 d'une hFSH recombinante commerciale sont respectivement de 0,08 et 1,81, soit un rapport de plus de 20 fois pour des molécules de pureté identique. Si, *in vivo*, les formes acides sont de loin les plus actives, ce sont les isoformes basiques qui, *in vitro*, présentent les activités biologiques les plus élevées mais dans un rapport de seulement 3 fois entre les extrêmes. En accord avec cette observation, les activités biologiques *in vivo* des isoformes mesurées par la stimulation de la croissance ovarienne chez la rate sont corrélées de manière étroite à leurs demi-vies respectives dans la circulation (< 2 h pour l'isoforme de pI 5,49 et > 30 h pour l'isoforme de pI 4,27). Par conséquent, c'est essentiellement la richesse en isoformes acides d'une préparation de hFSH recombinante qui détermine son activité biologique *in vivo*. En analysant les données

concernant les activités des isoformes de l'une des hFSH commerciales [7, 18], nous pouvons calculer que la moitié la plus acide des isoformes (pI inférieure à environ 4,9) est responsable d'environ 80 % de l'activité biologique *in vivo* de l'ensemble. Il serait donc intéressant d'augmenter l'activité et l'homogénéité des préparations de hFSH recombinante en obtenant leur sialylation la plus haute possible, en favorisant la synthèse de chaînes tri- et tétra-antennées (plutôt que mono- et bi-antennées) et leur sialylation la plus complète possible. Cela pourrait être obtenu, soit en surexprimant les glycosyl-transférases *ad hoc* dans les cellules productrices [19], soit en procédant à la « finition » des chaînes oligosaccharidiques de la hFSH en milieu acellulaire.

L'association covalente des sous-unités des gonadotrophines par voie chimique ou par voie génétique n'entraîne pas une diminution de leur vitesse d'élimination de la circulation. Par conséquent, les hFSH recombinantes monocaténaires β - α ou possédant des ponts disulfures interchaînes α -S-S- β ne sont pas susceptibles de présenter des activités biologiques *in vivo* supérieures à celle de la hFSH recombinante sauvage. En revanche, l'augmentation de leur stabilité thermique pourrait permettre d'augmenter significativement leurs délais de péremption voire d'envisager de les administrer sous forme d'implants ou de microsphères.

Le peptide carboxy-terminal (CTP) de hCG β confère à hCG une demi-vie très largement supérieure à celles de hLH et de hFSH qui ne possèdent pas une telle extension. Une FSH recombinante chimère possédant le CTP de hCG (résidus 118-145) à l'extrémité de sa sous-unité β présente une demi-vie augmentée ainsi qu'une activité biologique *in vivo* accrue de stimulation de la croissance ovarienne chez la rate [20]. Lorsque deux CTP au lieu d'un seul sont placés en tandem à l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité β , l'activité biologique *in vivo* de la hFSH est augmentée de manière encore plus importante. L'augmentation observée de la demi-vie est corrélée à l'augmentation de la demi-vie de l'hormone. Plus récemment, il a

été montré que le CTP de hCG pouvait être retiré de sa position initiale et fusionné à l'extrémité amino-terminale de sa sous-unité α ou de sa sous-unité β et conférer à cette hormone chimérique une activité biologique *in vivo* identique à celle de l'hormone sauvage [21]. Dans cette hCG chimérique, le CTP de la sous-unité α est normalement O-glycosylé et porte des résidus d'acide sialique comme le CTP sur la sous-unité β de l'hormone naturelle. Puisque la demi-vie de la hCG désialylée est considérablement diminuée, il est probable que les acides sialiques des O-saccharides du CTP jouent un rôle essentiel dans la très forte activité biologique *in vivo* de cette hormone – probablement en provoquant un déploiement du CTP qui augmente le volume moléculaire de hCG – et augmentent le nombre des charges négatives de la molécule. La désialylation de la hFSH naturelle ou de la hFSH recombinante sauvage conduit également à une diminution drastique de sa demi-vie initiale pourtant déjà beaucoup plus faible que celle de hCG.

Puisque le CTP augmente la demi-vie des gonadotrophines – qu'il soit placé en position normale (carboxy-terminale de la sous-unité β) ou à l'extrémité amino-terminale de la sous-unité α – il a été utilisé comme lien entre les sous-unités de la hFSH [13] afin de conférer à cette hFSH chimérique monocaténaire β -CTP- α une demi-vie augmentée par rapport à la hFSH monocaténaire β - α . L'association covalente des sous-unités n'entraîne pas en soi une augmentation de l'activité *in vivo* des gonadotrophines; en effet, à 37 °C, la vitesse de dissociation de leurs sous-unités est lente du fait du potentiel redox du plasma qui défavorise l'ouverture du pont disulfure bouclant la ceinture de sécurité de la sous-unité β autour de la sous-unité α . C'est donc la présence du CTP sialylé qui joue un rôle primordial dans l'augmentation de la demi-vie et, par conséquent, de l'activité biologique *in vivo* des gonadotrophines.

Liaison aux récepteurs membranaires

L'élimination des chaînes oligosaccharidiques n'empêche pas la liaison spécifique des gonadotrophines à

leurs récepteurs. Bien au contraire, les affinités des gonadotrophines déglycosylées pour leurs récepteurs sont augmentées. Lorsque les gonadotrophines humaines sont seulement désialylées par la neuraminidase, on observe également une augmentation de l'affinité indiquant que ce sont les charges négatives des résidus terminaux d'acide sialique (NANA) qui défavorisent l'interaction hormone-récepteur. Cette répulsion électrostatique entre les charges négatives des acides sialiques de l'hormone et celles de la membrane (acides sialiques du récepteur et groupements phosphate des phospholipides de la bicouche lipidique) explique pourquoi les isoformes acides de hFSH présentent des affinités plus basses pour le récepteur que les isoformes basiques [10, 18]. L'association non covalente des sous-unités de hFSH est indispensable à sa liaison au récepteur. Leur association covalente par les différentes méthodes citées plus haut ne diminue pas leur activité biologique [13, 18] indiquant que la séparation des

sous-unités après liaison au récepteur n'est pas requise pour la transduction du signal hormonal. Pour ce qui concerne la spécificité d'interaction des hormones glycoprotéiques à leurs récepteurs respectifs, tous les travaux récents plaident – qu'ils y fassent référence ou non – en faveur du modèle de « spécificité négative » [22] schématisé sur la figure 4. Dans ce modèle, la sous-unité α joue un rôle prépondérant dans la forte affinité non spécifique des hétérodimères $\alpha\beta$ pour les récepteurs tandis que les sous-unités β déterminent la spécificité des interactions hormone-récepteur en inhibant la liaison de chaque hormone aux récepteurs des autres hormones glycoprotéiques. Le remplacement de la séquence β 94-104 entre les deux dernières cystéines de la sous-unité β de hFSH par la séquence correspondante de hLH β entraîne la perte totale de l'activité FSH de l'hormone et ne lui confère aucune activité LH [20]. Par ailleurs, l'introduction de la séquence β 88-91 de hFSH (DSDS) dans la sous-unité β de hCG pro-

voque la perte de l'activité LH de hCG sans lui conférer aucune activité FSH [23, 24]. Inversement, le remplacement de cette séquence DSDS de hFSH β par la séquence correspondante de hLH β (RRST) n'a pas modifié l'activité FSH de l'hormone mais lui a conféré une activité LH [25]. Toutes les FSH β et TSH β connues de diverses espèces présentent des séquences très apparentées à DSD au niveau des positions correspondant aux résidus β 88-90 de hFSH β . En revanche, les hormones à activité LH présentent des séquences assez diverses à ce niveau. Pour cette raison, nous avons postulé que ce n'est pas la présence d'une séquence spécifique de cette position qui confère l'activité LH aux hormones mais l'absence de la séquence DSD (ou apparentée) qui autorise cette activité. Cette séquence β 88-90 apparaît donc comme un site spécifique d'inhibition de liaison aux récepteurs LH.

Toutes les hormones à activité LH présentent des résidus GP aux positions correspondant aux résidus VR de hFSH β . Néanmoins, toutes les FSH possèdent à cet endroit une séquence VR. Par conséquent, il est encore difficile d'affirmer si c'est la présence de la séquence VR ou l'absence de la séquence GP qui détermine l'activité FSH de ces hormones. Afin de répondre à cette question, nous avons produit dans notre laboratoire des LH recombinantes avec des mutations diverses sur ces positions et nous en étudions actuellement les activités FSH.

La comparaison des séquences d'acides aminés des sous-unités α de 29 espèces de vertébrés indique que chez toutes ces espèces sauf l'homme, le chimpanzé et l'orang-outan, on trouve des acides aminés basiques (Arg ou Lys) en positions 11, 13, 16 et 20. La mutation en lysine des quatre acides aminés sur ces positions dans la sous-unité α humaine entraîne une forte augmentation des activités de liaison et de stimulation des activités de hTSH et de hCG [26] dans leurs systèmes respectifs *in vitro* et *in vivo*. L'effet sur l'activité de hFSH n'a pas été étudié mais mériterait de l'être car il s'agit de la première observation d'une augmentation d'activité *in vivo* non fondée sur un changement de demi-vie.

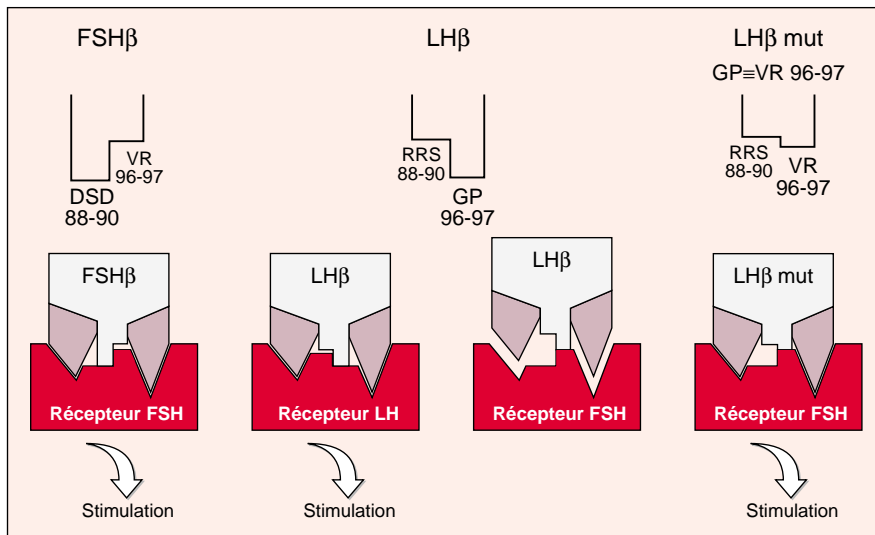


Figure 4. **Mécanisme de spécificité négative.** La « ceinture de sécurité » des sous-unités β (en gris clair) enserrant la sous-unité commune α (en bistre) porte les séquences responsables de la spécificité de liaison de chaque hétérodimère. Dans ce modèle, la sous-unité α est responsable de la haute affinité de toutes les hormones de cette famille pour l'ensemble des récepteurs et les séquences DSD et GP sont responsables de l'inhibition de liaison des hétérodimères respectivement aux récepteurs LH et FSH. En l'absence de ces deux séquences, par exemple en mutant la LH β dans la région contenant les GP96-97 (à droite), on obtient une molécule possédant une activité de liaison au récepteur FSH en plus de son activité initiale de liaison au récepteur LH. Code à une lettre des acides aminés: A: Ala; C: Cys; D: Asp; E: Glu; F: Phe; G: Gly; H: His; I: Ile; K: Lys; L: Leu; M: Met; N: Asn; P: Pro; Q: Gln; R: Arg; S: Ser; T: Thr; V: Val; W: Trp; Y: tyr.

Stimulation des cellules cibles

A l'inverse de la liaison au récepteur, la stimulation par hFSH des réponses cellulaires est tributaire de la présence de certaines chaînes oligosaccharidiques. En effet, les gonadotrophines déglycosylées sont des antagonistes des hormones natives correspondantes *in vitro*. L'élimination ponctuelle, par mutagenèse dirigée, de chacune des quatre chaînes N-oligosaccharidiques de hFSH sur les Asn α 52, α 78, β 7 et β 24 a permis de montrer que c'est essentiellement celle portée par l'Asn α 52 qui est impliquée [27]. Il est intéressant de noter que, dans la structure tridimensionnelle de hCG, cette chaîne oligosaccharidique de l'Asn α 52 est proche de la « ceinture de sécurité » formée par la sous-unité β et impliquée dans la spécificité d'interaction avec le récepteur (figure 2). Deux hypothèses sont avancées pour expliquer le rôle de cette chaîne N-saccharidique de la sous-unité α dans l'action des gonadotrophines. La première est qu'après liaison de l'hormone à son récepteur, cette chaîne interagit secondairement avec une lectine membranaire impliquée dans la transduction du signal [28]. La seconde est que la présence de cette chaîne est simplement indispensable à l'acquisition et/ou au maintien de la conformation correcte des chaînes peptidiques de l'hormone [29, 30]. Les premiers résultats, obtenus depuis quelques années par l'étude de gonadotrophines recombinantes mutées ponctuellement ou par cassettes, ont permis de dégager les rôles d'un certain nombre de résidus d'acides aminés ou de régions polypeptidiques dans la transduction du signal. Une région particulièrement importante est l'extrémité carboxyterminale de la sous-unité α commune; en effet, diverses mutations ou troncations des résidus situés au-delà de la dernière demi-cystine de cette sous-unité conduisent à des molécules inactives [31]. Cela montre bien que le rôle de la sous-unité α n'est pas seulement de conférer aux sous-unités β spécifiques leur conformation active mais aussi de participer directement à la liaison hormone-récepteur – comme cela est indiqué plus haut – ainsi qu'à la transduction du signal [14].

Conclusions et perspectives

Les différents éléments de la structure très complexe de la hFSH (sous-unités α et β ; portions polypeptidiques et oligosaccharidiques) jouent des rôles complémentaires, mais chacun primordial, dans les différentes étapes (demi-vie, affinité, spécificité, transduction) de son action biologique. De ce fait, la connaissance de sa structure tridimensionnelle serait d'une aide considérable. Néanmoins, la modélisation d'agonistes resterait difficile car la liaison fait essentiellement intervenir le très grand domaine extracellulaire du récepteur et la transduction le non moins grand domaine à 7 segments transmembranaires de celui-ci. Un agoniste simple à forte activité copié sur la structure de la hFSH sera donc probablement difficile à obtenir. Des travaux récents ont montré la possibilité de produire des hormones glycoprotéiques recombinantes mutées présentant une activité biologique accrue [27] au niveau de leur liaison aux récepteurs. Cependant, de telles hormones risquent d'être immunogènes du fait de la présence de nouveaux épitopes dans les régions mutées. Le récepteur de FSH, comme le récepteur β -adrénergique, existe certainement sous au moins deux conformations différentes en équilibre – active et inactive – et on peut espérer découvrir des ligands, apparentés ou non à FSH, susceptibles de stabiliser la conformation active. La seule voie d'amélioration à court terme de la qualité des FSH recombinantes semble être l'augmentation de leur demi-vie et la diminution de leur polymorphisme par l'obtention de chaînes saccharidiques tri- ou tétra-antennées et leur sialylation la plus complète possible. A plus long terme, il faudrait réussir à développer des stimulateurs ovariens synthétiques permettant de se passer de la hFSH elle-même car sa pureté, sa complexité, son hétérogénéité et sa fragilité constituent toujours des problèmes difficiles. Le succès d'un tel programme ne peut passer que par l'approfondissement de nos connaissances de la hFSH, de ses récepteurs et des voies de signalisation de ses cellules cibles ■

RÉFÉRENCES

1. Wu H, Lustbader JW, Liu Y, Canfield RE, Hendrickson WA. Structure of human chorionic gonadotropin at 2.6 Å resolution from MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Structure* 1994; 2: 545-58.
2. Laphorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, et al. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 1994; 369: 455-61.
3. Ruddon RW, Sherman SA, Bedows E. Protein folding in the endoplasmic reticulum: lessons from the human chorionic gonadotropin subunit. *Protein Sci* 1996; 5: 1443-52.
4. Hartree AS, Renwick AGC. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem J* 1992; 287: 665-79.
5. Skelton TP, Hooper LV, Srivastava V, Hinds Gaul O, Baenziger JU. Characterization of a sulfotransferase responsible for the 4-O-sulfation of terminal beta-N-acetyl-D-galactosamine on asparagine-linked oligosaccharides of glycoprotein hormones. *J Biol Chem* 1991; 266: 17142-50.
6. Smith PL, Baenziger JU. Molecular basis of recognition by the glycoprotein hormone-specific N-acetylgalactosamine-transferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 329-33.
7. De Leeuw R, Mulders J, Voortman G, et al. Structure-function relationship of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon®). *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 361-9.
8. Amoresano A, Siciliano R, Orru S, et al. Structural characterisation of human recombinant glyco hormones follitropin, lutropin and choriogonadotropin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem* 1996; 242: 608-18.
9. Ulloaguirre A, Cravioto A, Damianmatsumura P, et al. Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Hum Reprod* 1992; 7: 23-30.
10. Cerpa-Poljak A, Bishop LA, Hort YJ, et al. Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and *in vitro* bioactivity. *Endocrinology* 1993; 132: 351-6.
11. Howles CM. Genetic engineering of human FSH (Gonal-F®). *Hum Reprod* 1996; 2: 183-9.
12. Mulders JWM, Derksen M, Swolfs A, Maris F. Prediction of the *in vivo* biological activity of human recombinant follicle-stimulating hormone using quantitative isoelectric focusing. *Biologicals* 1997; 25: 269-81.
13. Sugahara T, Sato A, Kudo M, et al. Expression of biologically active fusion gene encoding the common α subunit and the follicle-stimulating hormone β subunit. *J Biol Chem* 1996; 271: 10445-8.
14. Arnold CJ, Liu C, Lindau-Shepard B, et al. The human follitropin α -subunit C terminus collaborates with a β -subunit cystine noose and an α -subunit loop to assemble a receptor-binding domain competent for signal transduction. *Biochemistry* 1998; 37: 1762-8.

RÉFÉRENCES

15. Heikoop JC, Van Den Boogaart P, Mulders JWM, Grootenhuis PDJ. Structure-based design of intersubunit disulfide bonds in gonadotropins. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 658-62.
16. Galway AB, Hsueh AJW, Keene L, et al. *In vitro* and *in vivo* bioactivity of recombinant human follicle-stimulating hormone and partially deglycosylated variants secreted by transfected eukaryotic cell lines. *Endocrinology* 1990; 127: 93-100.
17. Richard F, Robert P, Rémy JJ, et al. High-level secretion of biologically active recombinant porcine follicles-stimulating hormone by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 (sous presse).
18. Olijve W, De Boer W, Mulders JWM, Van Wezenbeek PMGF. Molecular biology and biochemistry of human recombinant follicle stimulating hormone (Puregon®). *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 371-82.
19. Possee RD. Baculoviruses as expression vectors. *Curr Opin Biotechnol* 1997; 8: 569-72.
20. Fares FA, Sukanuma N, Nishimori K, et al. Design of a long-acting follitropin agonist by fusing the C-terminal sequence of the chorionic gonadotropin β subunit to the follitropin β subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4304-8.
21. Furuhashi M, Shikone T, Fares FA, et al. Fusing the carboxy-terminal peptide of the chorionic gonadotropin (CG) β -subunit to the common α -subunit: retention of O-linked glycosylation and enhanced bioactivity of chimeric human CG. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 54-63.
22. Combarnous Y. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocrinol Rev* 1992; 13: 670-91.
24. Han Y, Bernard MP, Moyle WR. hCG β residues 94-96 alter LH activity without appearing to make key receptor contacts. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 124: 151-61.
23. Moyle WR, Campbell RK, Myers RV, et al. Co-evolution of ligand-receptor pairs. *Nature* 1994; 368: 251-5.
25. Dias JA, Zhang Y, Liu X. Receptor binding and functional properties of chimeric human follitropin prepared by an exchange between a small hydrophile intercysteine loop of human follitropin and human lutropin. *J Biol Chem* 1994; 269: 25289-94.
26. Szkudlinski MW, Teh NG, Grossmann M, Tropea JE, Weintraub BD. Engineering human glycoprotein hormone superactive analogues. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 1257-63.
27. Keene JL, Nishimori K, Galway AB, et al. Recombinant deglycosylated human FSH is an antagonist of human FSH action in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1994; 2: 175-80.
28. Amano J, Kobata A. Direct interaction of the sialic acid residue of human lutropin and chorionic gonadotropin with target cell is necessary for the full expression of their hormonal action. *Arch Biochem Biophys* 1993 305: 618-21.
29. Purohit S, Shao K, Balasubramanian SV, Bahl OP. Mutants of human choriogonadotropin lacking N-glycosyl chains in the α -subunit. 1. Mechanism for the differential action of the N-linked carbohydrates. *Biochemistry* 1997; 36: 12355-63.
30. Heikoop JC, Van Den Boogaart P, De Leeuw R, et al. Partially deglycosylated human choriogonadotropin, stabilized by intersubunit disulfide bonds, shows full bioactivity. *Eur J Biochem* 1998; 253: 354-6.
31. Zeng H, Ji I, Ji TH. Lys91 and His90 of the α -subunit are crucial for receptor binding and hormone action of follicle-stimulating hormone (FSH) and play hormone-specific roles in FSH and human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 1995; 136: 2948-53.

TIRÉS À PART

Y. Combarnous.

Summary

Structure and structure-function relationships of human recombinant FSH

As a glycoprotein hormone, follicle-stimulating hormone (FSH) exhibits a highly complex structure with two different non-covalently associated subunits (the common α and the specific β) both bearing two N-linked carbohydrate chains. Until now, recombinant human FSH with *in vivo* activity could be obtained only in mammalian host cells because other usual eukaryotic cell systems such as insect cells and yeasts do not synthesize the correct complex carbohydrates that are necessary for sufficiently long half-life in plasma. Many recent studies have dealt with the delineation of the regions of the molecule that are involved in the successive steps of the hormone action: half-life in blood and bioavailability, affinity and specificity of binding to the FSH receptor, efficiency of signal transduction after binding and target cell desensitization. The present paper deals with our current knowledge of the involvement of the peptide and carbohydrate portions of the α and β subunits in these steps and future prospects in the development of better recombinant human FSHs or simpler molecules with FSH activity.



GROUPE DE RÉFLEXION SUR LA RECHERCHE CARDIOVASCULAIRE

Sous le parrainage de l'INSERM et de la Société Française de Cardiologie

22-23 avril 1999

Deauville-Palais des Congrès

Secrétariat scientifique (Résumés)

Pr. C. Thuillez, Service Pharmacologie, CHU - Rouen, 76031 Rouen Cedex

Fax : 02 32 88 90 49 - e.mail : christianthuillez@chu.rouen.fr

Administration (Inscriptions et réservations hôtelières)

Deauville Organisation, Catherine Cutullic, BP 112 - 14800 Deauville

Tél : 02 31 98 54 44 - Fax : 02 31 88 65 76