

Syndrome de Kallmann (KS) : étude de corrélation phénotype/génotype et des modes de transmission de mutations PROK2 et PROKR2 : caractérisation d'un nouveau gène responsable de KS, l'alpha dystrobrévine

Julie Sarfati

▶ **To cite this version:**

Julie Sarfati. Syndrome de Kallmann (KS) : étude de corrélation phénotype/génotype et des modes de transmission de mutations PROK2 et PROKR2 : caractérisation d'un nouveau gène responsable de KS, l'alpha dystrobrévine. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05T076 . tel-01124038

HAL Id: tel-01124038
https://theses.hal.science/tel-01124038

Submitted on 27 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

THÈSE DE DOCTORAT

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Spécialité : **Génétique**

École doctorale : **Génétique, Cellulaire, Immunologie, Infectiologie et Développement**

Présentée par

Julie SARFATI

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Paris Descartes

Titre

Syndrome de Kallmann (KS): Etude de corrélation phénotype/génotype et des modes de transmission de mutations *PROK2* et *PROKR2*. Caractérisation d'un nouveau gène responsable de KS, *l'alpha dystrobrévine*.

Thèse dirigée par le **Docteur Catherine DODE**

Soutenue le Vendredi 6 juillet 2012

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Daniel RICQUIER Président

Madame le Professeur Sophie CHRISTIN-MAITRE Rapporteur

Madame le Professeur Anne BARLIER Rapporteur

Monsieur le Professeur Reiner VEITIA Examinateur

Monsieur le Professeur Jean-Michel DUPONT Examinateur

Madame le Docteur Catherine DODE Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier de nombreuses personnes qui ont participé, par leur soutien, leurs aides techniques et/ou morales, leurs sourires, leurs encouragements à l'aboutissement de ce travail de thèse de doctorat.

Le ***Dr Catherine Dodé*** qui m'a accordé sa confiance et m'a inclus avec chaleur dans l'équipe Kallmann, qui a toujours cru en ce projet malgré les difficultés rencontrées à chaque étape et en ma capacité à les contourner, qui dans nos échanges m'a introduit dans un monde scientifique nouveau et qui a toujours su m'encourager dans les moments de doute,

Le ***Pr Marc Delpech*** pour son accueil dans son équipe et ses multiples lettres de recommandation au cours de ce long parcours,

Le ***Pr Daniel Ricquier*** qui a accepté d'être le président du jury de ma soutenance de thèse,

Les ***Prs Sophie Christin-Maitre et Anne Barlier*** qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de cette thèse malgré les multiples tâches qui leurs incombent, je vous remercie très chaleureusement. L'accueil favorable que vous avez fait à mon travail a été l'éclaircie du mois de juin.

Les ***Prs Reiner Veitia et Jean-Michel Dupont*** qui ont accepté d'être examinateurs de ce travail,

Le ***Pr Jacques Young*** pour son soutien toujours renouvelé, la place qu'il m'a faite auprès de lui dans l'équipe de Bicêtre, sa valorisation dans des moments difficiles, sa stimulation intellectuelle, ses idées multiples, sa proactivité, ses nombreux projets, ses mails concis et précis…,

Le ***Pr Philippe Chanson*** pour son soutien également, son calme et sa sérénité affichée et la bataille menée pour conserver le poste de chef de clinique assistant à Bicêtre que je suis ravie de prendre à la rentrée,

Le ***Pr Philippe Bouchard*** qui a été l'initiateur de ce projet quand je cherchais un laboratoire d'accueil pour un master,

Le ***Dr Luis teixeira*** sans qui sûrement cette aventure n'aurait pas eu lieu, je ne sais pas encore si je dois te maudire ou te remercier…Merci de ta patience, tes réponses qui rendent les questions intelligentes et de ton soutien,

Les ***Drs Pierre Lhuillier et Séverine Marcos*** qui ont, chacun leur tour, chacun dans leur style, apporté du sang neuf, de la rigueur et de la bonne humeur dans notre équipe, merci séverine pour ces magnifiques photos et tes corrections pleines de bon sens,

Brigitte Nedelec dont j'ai eu le plaisir de partager le bureau ses derniers mois de thèse, merci pour ton sourire et ton écoute. J'espère que tu trouveras une place qui te convient, et

Pierre-Raphael, ton enthousiasme pour la science m'a maintenu plusieurs fois au dessus du gouffre de la mélancolie,
L'Equipe de Jamel Chelly et en particulier ***Juliette, Yoann*** mes codoctorants, nos rencontres du couloir me manqueront…***Laetitia*** dont la bonne humeur traverse le couloir, ***Kakou, Pierre*** pour votre disponibilité quotidienne,
L'Equipe d'Evelyne Bloch-Gallego pour votre apprentissage, de la culture cellulaire au plaisir de l'hybridation *in situ* et l'immuno…***Stéphanie*** qui j'espère gardera son flegme et sa douceur à l'arrivée du 2ème, qui en plus de m'avoir tant montrée, tant écoutée et soutenue, a habillé ma fille pendant 2 ans ! et ***Aurélie*** dont j'admire la rigueur et la capacité de travail, j'espère que l'avenir s'éclaircira,
Les filles de Cassini, ***Corinne et Chrystel***, pour leur gentillesse à mes débuts, votre disponibilité, vos sourires magré mon exil à la fac et mes visites espacées,
L'Equipe de JM Dupont et particulièrement ***Dominique***, de la FISH au CGH, j'ai beaucoup appris à tes côtés,
L'équipe de séquençage et génomique pour leur aide techinique,

Enfin, mes proches, mes parents, ***ma mère, Véra*** qui m'a beaucoup soutenu tout au long de cette thèse, qui n'a jamais douté et dont l'influence a joué sur ma présence à cette place aujourd'hui, ***mon père, Alain*** qui a aussi été un supporter, un de mes plus grands regrets en quittant Cochin sera nos déjeuners hebdomadaires…
Mes amies, les filles, mes poulettes, à votre patience et compréhension de ce long parcours,

Mon homme, mon amour, mon ***Carl***, qui dans cette thèse là aura son nom inscrit, qui malgré ses réticences et ses doutes m'a toujours soutenu au cours de ce projet, sur tous les plans, qui s'est occupé de notre princesse en père exemplaire, grâce à qui j'ai retrouvé le sourire tous les soirs en dépit des aléas de la recherche, mon socle, mon bouclier sans qui je n'aurai pas tenu et qui sera fier de moi à la fin de cette aventure,
Il persistera toujours une question, pourquoi ?

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS…….....p5

LISTE DES FIGURES……..p15

LISTE DES TABLEAUX……..p17

LISTE DES ABREVIATIONS…….p19

INTRODUCTION……...p25

I Le syndrome de Kallmann est une maladie du développement embryonnaire……...p27

I.1 Embryogénèse du système olfactif murin……p27

I.1.1 Formation de la cavité nasale……...p27

I.1.2 Développement de l'épithélium olfactif et du nerf olfactif……p28

I.1.3 Le nerf voméronasal et le nervus terminalis……p30

I.1.4 Développement du BO……p31

I.2 Les cellules synthétisant la GnRH1……p33

I.2.1 Origine des cellules synthétisant la GnRH1……...p34

I.2.2 Migration des cellules synthétisant GnRH1……...p34

I.3 Le syndrome de Kallmann associe une anomalie de développement du système olfactif et un défaut de migration des cellules synthétisant la GnRH1……p36

II Signes cliniques du syndrome de Kallmann……...p39

II.1 Signes cardinaux…….....p39

II.1.1 L'hypogonadisme hypogonadotrope……p39

II.1.2 Le déficit olfactif……p40

II.2 Signes cliniques associés……p41

II.2.1 Symptômes neurologiques……p41

II.2.2 Atteinte de la ligne médiane……p41

II.2.3 Atteinte rénale……...p42

II.3 Diagnostics différentiels……...p42

II.3.1 L'HH congénital normosmique……...p43

II.3.2 Le syndrome CHARGE……p43

III Génétique du syndrome de Kallmann……p46

III.1 Difficultés de caractérisation de gènes KS……...p46

III.2 Gènes KS : Fonction……p46

III.2.1 KAL1 code pour l'anosmine 1……p46

III.2.2 FGFR1 et FGF8……...p48

III.2.3 PROK2 et PROKR2……p50

III.2.4 CHD7……p54

III.2.5 WDR11 et HS6ST1……p55

III.3 Mode de transmission……...p58

III.4 Corrélation génotype/phénotype……p59

III.4.1 HH et déficit olfactif……p59

III.4.2 Signes associés……...p61

III.5 Autres pathologies associées à des mutations de gènes KS……p62

III.4.1 HH normosmique isolé……...p62

III.4.2 Aménorrhée hypothalamique fonctionnelle (AHF)……p63

III.4.3 Fente labiale non syndromique……p63

III.4.4 Holoprosencéphalie (HPE)……p64

III.4.5 Dysplasie septo-optique (DSO) et déficit hypophysaire combiné multiple……p64

IV Objectifs de la thèse……..p65

PATIENTS et METHODES……p67

I Patients……p68
I.1 Patients participant à l'étude rythme et sommeil……p68
I.2 Données cliniques du patient porteur de la translocation complexe initialement 46, XY, inv (3) (q24q26.32), t (3 ; 13 ; 18) (q26.32 ; q21.2 ; q12.2)……p68
I.3 Données cliniques des patients chez qui une mutation de l'alpha dystrobrévine a été recherchée……..p68

II Méthodes……p69
II.1 Questionnaires collectés pour l'étude rythme et sommeil……p69
II.2 Préparation des ADNs génomiques……p69
II.3 Hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur chromosomes……p69
II.3.1 Préparation des sondes……...p69
II.3.2 Préparation chromosomique……...p69
II.3.3 Hybridation……p70
II.3.4 Rinçages……p70
II.3.5 Analyse microscopique……p70
II.4 Puces à ADN ou CGH (Comparison genomic hybridization) array……p70
II.4.1 Marquage de l'ADN……...p70
II.4.2 Hybridation……..p70
II.4.3 Lavage et séchage……....p71
II.4.4 Analyse des lames……....p71
II.5 Hybridation *in situ*……..p71
II.5.1 Fabrication des sondes……p71
II.5.2 Hybridation des lames……..p72
II.6 Protocole d'immunofluorescence des coupes d'embryons de souris sauvages aux stades E11.5, E12.5 et E13.5……p72
II.7 PCR/séquençage……p73
II.8 DHPLC……..…p74
II.9 Fabrication du minigène……...p74
II.9.1 PCR « long range »……...p74
II.9.2 Clonage du fragment PCR……...p75
II.9.3 Mutagénèse dirigée……...p76
II.10 Transfection du minigène……..……p76
II.10.1 Lignées cellulaires……...p76
II.10.2 Transfection des plasmides……...p77
II.11 Préparation des ARN messagers……..……p77
II.12 Fabrication des ADNc……..p77
II.13 PCR semi quantitative fluorescente……..……p77

RESULTATS et DISCUSSION……...…p81

Chapitre 1 : Mutations *PROK2* et *PROKR2* chez les patients KS : Etude de corrélation phénotype/génotype, du mode de transmission et de leur prévalence au sein de deux populations……...p83

I Etude de 55 patients KS porteurs de mutations *PROK2* ou *PROKR2*……...p83
I.1. Signes cliniques associés aux mutations *PROK2* et *PROKR2*……...…p85
I.2. Analyse du phénotype KS des patients mutés *PROK2* et *PROKR2*……...p88
I.3 Transmission digénique ou oligogénique des mutations *PROK2* et *PROKR2*……..p91

Article I: A comparative phenotypic study of kallmann syndrome patients carrying monoallelic and biallelic mutations in the prokineticin 2 or prokineticin receptor 2 genes.....p93

II Etude rythme et sommeil chez les patients KS porteurs de mutations *PROK2* ou *PROKR2*……..p95
II.1 Résultats……..p95

III Etude de la prévalence des mutations PROKR2 au sein des patients KS originaires du Maghreb……...p98
III.1 Résultats……p98

Article II: High prevalence of *PROKR2* mutations among Kallmann syndrome patients from Maghreb…….....p99

IV Discussion…….....p101
IV.1 Caractérisation d'un phénotype clinique des patients porteurs de mutations *PROK2* ou *PROKR2*…….p101
IV.2 Complexité des modes de transmission génétique de KS et notion de digénisme…….…….p103
IV.3 Conséquences pour le conseil génétique……...….p109
IV.4 Etude rythme et sommeil des patients mutés *PROK2* ou *PROKR2*……..….p110
IV.5 Etude de la prévalence des mutations *PROKR2* au sein des patients KS originaires du Maghreb……..…p112

Chapitre 2 : Caractérisation d'un nouveau gène KS à partir d'une translocation 3,13,18 chez un patient KS…….....p117

I Analyse cytogénétique d'une translocation 46, XY, inv (3) (q24q26.32), t (3 ; 13 ; 18) (q26.32 ; q21.2 ; q12.2)……...p117
I.1 Le chromosome der 3……..…….p118
I.2 Le chromosome der 13…….....p119
I.3 Le chromosome der 18…….....p120
I.4 Cartes des régions de point de cassures chromosomiques……..…p122

II Recherche d'insertions ou délétions associées à la translocation complexe.....p124

III L'alpha dystrobrévine…….....p125
III.1 Organisation du gène……p125
III.2 Caractéristiques structurales de la protéine……...p127
III.3 Fonction de l'alpha dystrobrévine…….....p128
III.4 Expression de l'alpha dystrobrévine au cours du développement…….....p131
III.5 Maladies génétiques associées aux protéines du complexe associé à la dystrophine…….……p131

IV Etude de l'expression de l'alpha dystrobrévine au cours de l'embryogénèse du système olfactif chez la souris…….p132
IV.1 Profil d'expression de l'alpha dystrobrévine au cours de l'embryogénèse du système olfactif murin……...p132
IV.1.1 Expression des transcrits DTNA……..……p132
IV.1.2 Expression et localisation de l'alpha dystrobrévine……..p133
IV.2 Caractérisation des cellules exprimant l'alpha dystrobrévine……..……p135

V Recherche de mutations au sein de la dystrobrévine alpha…….....p136

VI Etude des mutations sur l'épissage de l'exon 9……p142

VII Discussion…….....p147
VII.1 Caractérisation d'un nouveau gène KS…….p147
VII.2. L'implication de l'alpha dystrobrévine dans la pathogénie de KS……....p147
VII.3 Etude de la transcription des isoformes cérébrales mutées de l'alpha dystrobrévine……...p151

CONCLUSION ET PERSPECTIVES……..…p157

BIBLIOGRAPHIE……..…p161

ANNEXE I……..…..p177

ANNEXE II……...p181

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma de la cavité nasale en développement chez la souris du stade E.9 à E.11.5
Figure 2: Différenciation des neurones olfactifs
Figure 3: Schéma représentant la formation du nerf et du bulbe olfactif de E11.5 à E13 lors du développement embryonnaire murin
Figure 4: Développement murin de la placode olfactive et du BO
Figure 5: Schéma de l'axe gonadotrope humain
Figure 6: Migration des cellules synthétisant la GnRH1 dans le cerveau d'un embryon de souris
Figure 7: Schéma comparant le système olfactif et la distribution des neurones synthétisant la GnRH1 chez un fœtus contrôle et un fœtus Kallmann de 25 semaines
Figure 8: IRM des bulbes olfactifs normale et d'un patient KS
Figure 9: Classification étiologique des HH congénitaux
Figure 10: Exemples d'anomalies caractéristiques des oreilles de syndrome CHARGE
Figure 11: Structure de l'anosmine-1
Figure 12: Schéma de l'activation de FGFR1
Figure 13: Incorporation de BrdU sur le site du développement normal du bulbe olfactif à E12.5 chez la souris
Figure 14 : Mode de transmission des mutations *PROKR2* chez des patients KS
Figure 15 : Implication de PROK2 dans les rythmes circadiens murins
Figure 16: Altération du cycle circadien des souris *Prok2-/-* et *Prokr2-/-*
Figure 17: Prok2 et prise alimentaire chez le rat
Figure 18: Expression des gènes KS au cours de l'embryogénèse humaine pour KAL1 et murine pour les autres gènes KS
Figure 19: Morphogénèse des bulbes olfactifs chez les modèles murins
Figure 20: Expression des neurones synthétisant la GnRH1 dans l'aire préoptique des modèles murins
Figure 21: Exemples de variabilité phénotypique de 2 familles KS porteuses d'une mutation R622X de *FGFR1*
Figure 22: Variabilité des atteintes gonadotropes et olfactives dans 2 formes génétiques de KS liées à des mutations *PROKR2* et *FGF8*
Figure 23: Electrophorèse en gel d'agarose de la PCR « long range
Figure 24: Représentation schématique du minigène comprenant les exons 8, 9 et 10 et les séquences introniques IVS8 et IVS9, sous le contrôle d'un promoteur CMV.
Figure 25: Localisation dans le vecteur des amorces utilisées pour la PCR semi quantitative
Figure 26: Cycle du cortisol de 5 patients mutés PROK2 ou PROKR2
Figure 27 : Comparaison du phénotype gonadotrope du groupe d'hommes porteurs de mutation monoallélique *PROK2* ou *PROKR2* (Groupe 1) et des hommes porteurs de mutation *PROKR2* affectant sévèrement la signalisation Gq de PROKR2 (R164Q/+, Q210R/+, P290S/+) (Groupe 2).
Figure 28: Arbre généalogique d'une famille KS associant mutations *KAL1* et *PROKR2*
Figure 29: Arbre généalogique d'une famille HH normosmique chez laquelle s'associent des mutations de *FGFR1* et *GnRHR*.
Figure 30: Arbre généalogique d'une famille HH normosmique chez laquelle s'associent des mutations de *FGFR1*, *PROKR2* et *GnRH1*.
Figure 31: Caryotype partiel des 3 paires de chromosomes (3, 13, 18) porteurs de translocation.
Figure 32: Point de cassure du patient KS en 3q26.3
Figure 33: Point de cassure en 13q21.2.
Figure 34: Point de cassure en 18q12
Figure 35: Schéma des paires de chromosomes porteurs de translocation

Figure 36: Région du point de cassure chromosomique du malade KS en 18q12
Figure 37: Intervalle de localisation de l'anosmie congénitale isolée
Figure 38: Schéma des résultats des expériences de CGH du chromosome 17 du patient porteur de la translocation 3,13,18 (SignalMap)
Figure 39: Représentation des différentes isoformes de l'alpha dystrobrévine
Figure 40: Représentation de l'expression tissulaire des différentes isoformes de l'alpha dystrobrévine
Figure 41: Représentation schématique de l'isoforme la plus longue de l'alpha dystrobrévine
Figure 42 : Schéma du complexe de proteines associé à la dystrophine dans le muscle
Figure 43: Etude de l'expression en hybridation *in situ* de DTNA au cours de la formation du système olfactif murin
Figure 44: Etude de l'expression par immunofluorescence de l'alpha dystrobrévine dans le système olfactif murin en formation.
Figure 45: Caractérisation des cellules exprimant l'alpha dystrobrévine au cours du développement murin par co-immunofluorescence alpha dystrobrévine/β3tubuline
Figure 46: Caractérisation des cellules exprimant l'alpha dystrobrévine au cours du développement murin par co-immunofluorescence alpha dystrobrévine/GnRH1
Figure 47 : Electrophorégrammes des mutations de l'exon 8
Figure 48 : Electrophorégrammes des mutations de l'IVS 8
Figure 49: Schéma des 5 mutations de l'alpha dystrobrévine chez les 3 patients KS
Figure 50: Prédiction *in silico* des conséquences sur l'épissage des mutations de l'exon 8 selon human splice finder 2.4
Figure 51: Prédiction *in silico* des conséquences sur l'épissage des mutations de l'exon 8 selon fruitfly.org.
Figure 52 : Alignement multiple de la séquence protéique encadrant les 3 acides aminés codés par l'exon 9 de l'alpha dystrobrévine et de ses orthologues
Figure 53: Prédiction *in silico* des conséquences sur l'épissage des mutations de l'IVS 8 selon human splice finder 2.4
Figure 54 : Prédiction *in silico* des conséquences sur l'épissage des mutations de l'IVS 8 selon fruitfly.org
Figure 55 : Résultats de la transfection des minigènes sauvages, V334I et IVS8-35g>a dans les cellules HeLa
Figure 56 : Résultats de la transfection des minigènes sauvages et mutés dans les cellules Neuro2A.
Figure 57 : Résultats d'une PCR semi-quantitative après transfection des 5 minigènes dans des cellules Neuro2A
Figure 58: Représentation schématique de l'ensemble des résultats de PCR semi-quantitative après transfection de cellules Neuro2A
Figure 59: Arbres généalogiques des 2 familles ayant permis la localisation de l'anosmie congénitale isolée
Figure 60: Etude de l'expression par immunohistochimie de la NOS neuronale au cours du développement du système olfactif de rat

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Signes associés chez des patients KS dans 5 séries de la littérature
Tableau 2: Critères cliniques de diagnostic de syndrome CHARGE
Tableau 3: Récapitulatif des expressions des gènes KS dans le système olfactif au cours de l'embryogénèse murine
Tableau 4: Signes cliniques associés aux différentes formes génétiques de KS
Tableau 5: Amorces utilisées pour l'amplification PCR de l'alpha dystrobrévine
Tableau 6: Températures utilisées en DHPLC pour les différents exons de l'alpha dystrobrévine
Tableau 7 : Résumé des analyses fonctionnelles des mutations *PROKR2*
Tableau 8 : Signes associés chez des patients KS porteurs de mutations *PROK2*
Tableau 9 : Signes associés chez des patients KS porteurs de mutations *PROKR2*
Tableau 10 : Atteinte olfactive en fonction du génotype *PROK2* et *PROKR2*
Tableau 11: Génotype et phénotype des 5 patients ayant une transmission digénique démontrée de KS en association avec une mutation monoallélique de *PROKR2*
Tableau 12: Comparaison des résultats au questionnaire de rythme de Horne et Ostberg des groupes KS mutés *PROK2* ou *PROKR2*, témoins et KS non mutés
Tableau 13 : Comparaison des résultats au questionnaire de sommeil de Pittsburgh des groupes KS mutés *PROK2* ou *PROKR2*, témoins et KS non mutés
Tableau 14: Génotype et phénotype des patients HH porteurs de mutation de 2 gènes HH
Tableau 15 : BACs utilisés pour localiser les points de cassure de la translocation chromosomique complexe t(3;13;18) (q26.3;q21.2;q12.2)
Tableau 16: Récapitulatif des 7 régions variants en nombre de copie du patient KS porteur de la translocation complexe
Tableau 17: Fréquence des SNV dans la population KS et chez les contrôles (HAPMAP)
Tableau 18 : Proportion en moyenne de chacune des 2 isoformes après transfection de l'un des 5 minigènes
Tableau 19: Références des 5 mutations identifiées chez les 3 patients KS

LISTE DES ABREVIATIONS

α-MSH	α Melanocyte stimulating hormone
a.a	Acides aminés
ADN	Acide désoxyribonucleique
AHF	Aménorrhée hypothalamique fonctionnelle
AP	Alkaline phosphatase
ARN	Acide ribonucleique
BAC	Bacterial artificial chromosome
Bmal1	ou ARNTL aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
BO	Bulbe olfactif
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CGH	Comparison genomic hybridization
CHD7	Chromodomain helicase DNA-binding protein 7
Chr	Chromosome
CMV	Cytomegalovirus
Cy	Cyanine
DAPI	4',6'-diaminido-2-phenylindole
DCC	Deleted in colorectal carcinoma
Der	dérivé
DHPLC	Denaturing high performance liquid chromatography
Dlx5	Distal-less homeobox 5
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DS	Déviation standard
DSO	Dysplasie septo-optique
DTNA	Alpha dystrobrévine
DTNBP1	Dystrobrevin binding protein 1
DTT	Dithiothréitol
Enombre	Jour embryonnaire post coitum
EMX	Empty spiracles homeobox
ENO	Enolase
EO	Epithélium olfactif
ESE	Exonic splicing enhancer
ESS	Exonic splicing silencer
FAM	6-carboxy-fluorescine
FGFR1	Récepteur 1 des FGF
FGF	Fibroblast growth factor
FISH	Fluorescent in situ hybridization
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSH	Follicle-stimulating hormone
GAP43	Growth associated protein
GBA	Glucosidase beta acid
GLI2	GLI family zinc finger 2
GLI3	GLI family zinc finger 3
GnRH1	Gonadoliberine releasing hormone
GnRH1-R	Gonodoliberine releasing hormone receptor
HCl	Acide chlorhydrique
HGF	Hepatocyte growth factor
HH	Hypogonadisme hypogonadotrope
HPE	Holoprosencéphalie
HS	Heparane sulfate
HS6ST1	Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1
IMC	Indice de masse corporelle

IRM	Imagerie par résonnance magnétique
ISE	Intronic splicing enhencer
ISS	Intronic splicing silencer
Kb	Kilobase
Kiss1	Kisspeptine
Kiss1R	Récepteur des kisspeptines
KO	Knock out
KS	Syndrome de Kallmann
LDL	Low-density lipoprotein
LGMD	Limb girdle muscular dystrophy
LH	Luteinizing hormone
LOT	Lateral olfactory tract
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPT	Microtubule associated protein tau
Mash1	ou ASCL1 Achaete-scute complex homolog 1
Mb	Megabase
MEFV	Mediterranean fever
MGI	Mouse genome informatics
MM	Masse migratrice
NCAM	Neuronal cell adhesion molecule
NCBI	National center for biotechnology information
NCVI	Non compaction ventriculaire isolée
NELF	Nasal embryonic LHRH factor
NeuroD	Neuronal differentiation
Ng1	Neurogenin1
NGS	Normal goat serum
NO	Monoxyde d’azote
NOS	NO synthase
NSC	Noyau supra-chiasmatique
OMP	Olfactory marker protein
PAH	Phenylalanine hydroxylase
PAX6	Paired box 6
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformadéhyde
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
POMC	Proopiomélanocortine
PROK	Prokinéticine
PROKR	Récepteur de la prokinéticine
RMS	Rostral migratory stream
SDF1	Stromal cell-derived factor 1
SNV	Single nucleotide variant
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSC	Saline sodium citrate
STARP1	Steroidogenic acute regulator pseudogene 1
SVF	Serum veau foetal
SOX	SRY-box containing gene 2
TRITC	Tetramethylrhodamine isothiocyanate
TAC3	Tachynin 3
TACR3	Récepteur de tachynin 3
UV	Ultraviolet
VNO	Organe voméronasal
WDR	WD repeat domain

INTRODUCTION

Le syndrome de Kallmann de Morsier (KS) est défini par l'association d'un hypogonadisme hypogonadotrope (HH) et d'une altération de l'odorat, hyposmie ou anosmie.

L'association d'anomalies du système olfactif avec un hypogonadisme a été observée la première fois par Maestre de San Juan en 1956, un anatomopathologiste espagnol qui a décrit un sujet ayant des testicules de petite taille et l'absence de bulbes olfactifs (Maestre de San Juan 1856). En 1944, le psychiatre et généticien américain Franz Josef Kallmann individualisa le syndrome au sein de 3 familles et fit l'hypothèse de son caractère héréditaire (Kallmann et al. 1944). Dans les années 50, l'anatomopathologiste suisse de Morsier approfondit la connaissance du syndrome en décrivant plusieurs cas d'absence complète ou partielle des bulbes et du tractus olfactif chez des patients masculins atteints d'hypogonadisme et d'anomalie anatomique de la ligne médiane (de Morsier 1954; de Morsier 1962; de Morsier and Gauthier 1963). Il appela ce syndrome « dysplasie olfactogénitale » et il fut le premier à suggérer l'origine hypothalamique de l'hypogonadisme. Enfin, en 1971, l'origine hypothalamique de l'hypogonadisme fut démontré, secondaire à un déficit en gonadolibérine (GnRH) (Naftolin et al. 1971).

I Le syndrome de Kallmann est une maladie du développement embryonnaire

I.1 Embryogénèse du système olfactif murin

L'épithélium olfactif (EO) et le bulbe olfactif (BO), aux stades précoces de l'embryogénèse, vont se développer indépendamment, la formation de l'EO précède celle du BO. Puis une interaction entre les développements de ces 2 organes va apparaître.

I.1.1 Formation de la cavité nasale

L'EO dérive de la placode olfactive qui est une région de l'ectoderme crânial non neuronal présente dans la région rostro-caudale de la tête. Chez les rongeurs, la formation de la fosse nasale débute juste après la fermeture du tube neural. A E9, chez la souris, la placode olfactive est identifiée comme un épaississement épithélial. A E10, la placode olfactive s'est considérablement épaissie et commence à s'invaginer formant une protubérance à la surface de la tête (LaMantia et al. 2000) (Figure 1). A E10.5-E11, la fosse nasale s'est considérablement approfondie, commence à former des fossettes nasales (ébauches des narines) et l'épaississement devient un épithélium. Cet épithélium va générer 2 classes de cellules très distinctes, des cellules respiratoires et olfactives. La partie dorsolatérale donnera naissance à l'EO. Dans le même temps, il apparait une seconde invagination dans le mur médian de la cavité nasale, le futur organe voméronasal. A E11.5, l'organe voméronasal forme une cavité distincte. Pendant cette période, il y a un réalignement du système olfactif d'une position rostrolatérale à une position rostrale (Figure 1).

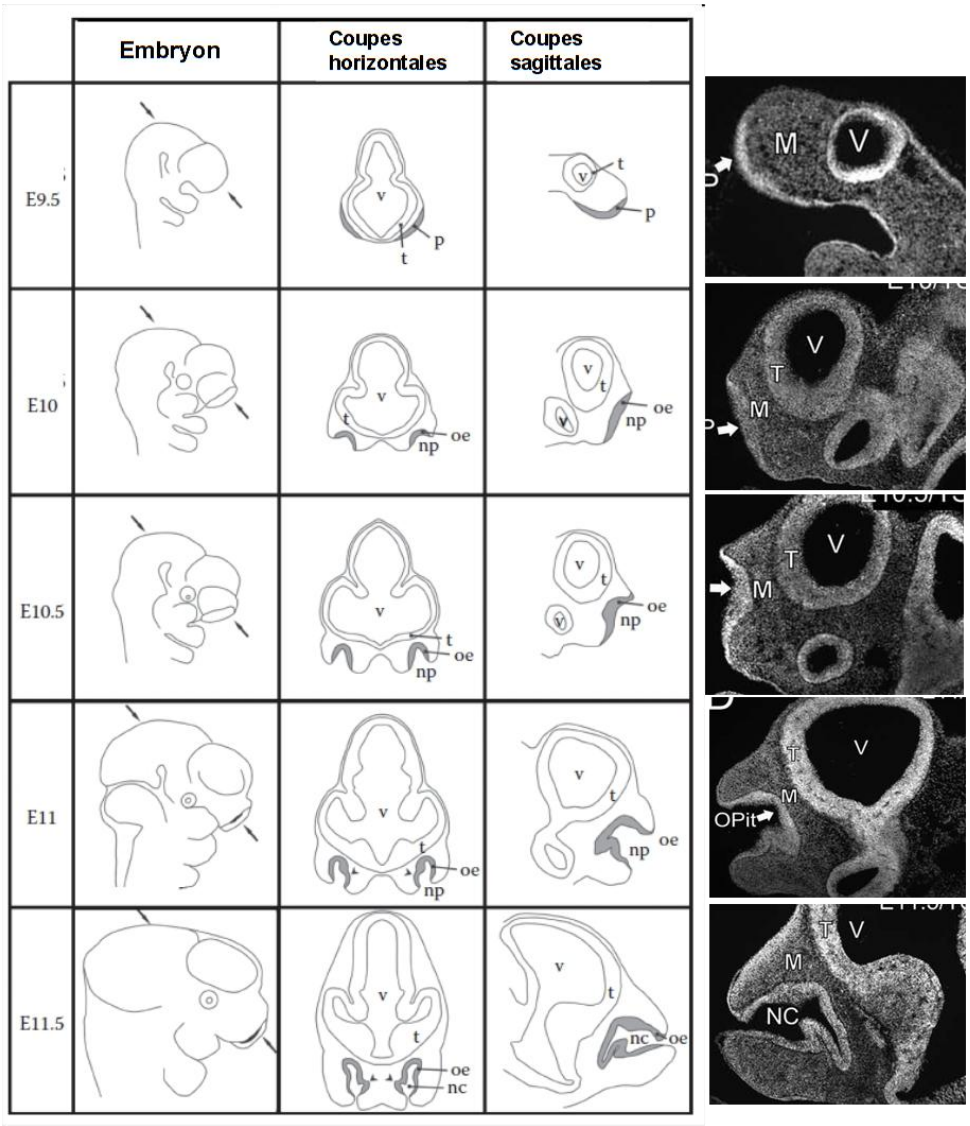


Figure 1 : Schéma de la cavité nasale en développement chez la souris du stade E.9 à E.11.5.

Les flèches au niveau des embryons indiquent le plan des coupes horizontales. Les flèches triangulaires à E11 et E11.5 pointent la seconde invagination qui va former l'organe voméronasal. t, télencéphale; v, ventricule; nc, la cavité nasale; np, fosse nasale; p, placode; oe, l'épithélium olfactif. D'après (Treloar et al. 2011).

I.1.2 Développement de l'épithélium olfactif et du nerf olfactif

L'EO est un neuroépithélium pseudostratifié comprenant différents types cellulaires. Les neurones sensitifs olfactifs, 2 sous populations des cellules basales (horizontales et globulaires) et des cellules de soutien. Ces différents types cellulaires se différencient dés E10 à partir d'un probable progéniteur commun. La différenciation des neurones olfactifs se fait à partir de progéniteurs transitoires exprimant les facteurs de transcription Mash1 puis Ng1 et NeuroD. Les neurones olfactifs différenciés se distinguent par une variété de

marqueurs dont Ncam et Gap-43. Enfin, le marqueur sélectif des neurones olfactifs, OMP (Olfactory marker Protein) est exprimé dans les neurones olfactifs matures (Figure 2).

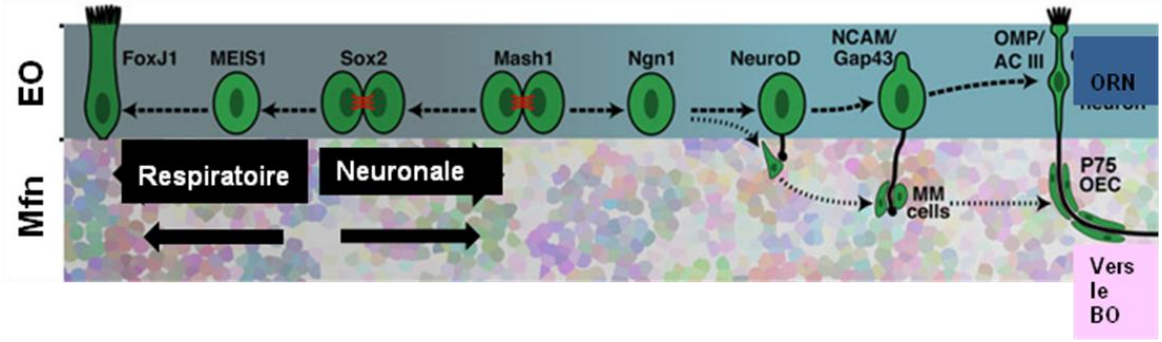


Figure 2 : Différenciation des neurones olfactifs.
EO: épithélium olfactif; Mfn: mésenchyme frontonasal; MM: masse migratrice, ORN: neurones olfactifs; BO: bulbe olfactif. D'après (Balmer and LaMantia 2005).

Dès la fin de leur différenciation, les neurones olfactifs étendent leurs axones au travers de la membrane basale de l'EO, dans le mésenchyme frontonasal pour débuter leurs navigations de l'EO en développement vers la portion rostrale du télencéphale, siège du futur BO (Figure 3). Ces axones migrent en association avec une population de cellules migrantes issues de la placode olfactive appelée « la masse migratrice » (ou MM) (Valverde et al. 1992). La nature exacte de ces cellules est encore incertaine mais, elle inclut des précurseurs des cellules gliales olfactives engainantes, des cellules exprimant la GnRH1 et des cellules OMP+, exprimant des récepteurs olfactifs qui pourraient être des guides de croissance axonale (Conzelmann et al. 2002). L'ordre de sortie de la placode olfactive, entre les axones des nerfs olfactifs et les cellules migratrices, n'est pas établi mais, les axones et les cellules migratrices migrent très tôt au cours du développement, au sein du mésenchyme, vers le télencéphale. La formation de cette voie olfactive est unique au sein des systèmes sensoriels car les axones des neurones olfactifs sont les seuls à ne pas suivre une voie migratrice établie. L'établissement de cette voie olfactive utilise des molécules de guidance présentes dans le mésenchyme et des molécules chémotrophiques relarguées par le télencéphale. La MM rentre en contact avec la surface du télencéphale à E11.5 (Figure 3). A E12, elle forme une couche présomptive des nerfs olfactifs avec l'entrée des axones olfactifs dans le système nerveux central au travers de petites fenestrations dans la membrane basale du télencéphale. Une petite sous population de ces axones ne se restreint pas à la couche des nerfs olfactifs et s'étend jusqu'à la zone ventriculaire du télencéphale où ils pourraient stimuler la formation du BO. A E12.5, ces axones profonds ne sont plus détectés dans la zone ventriculaire (leur devenir n'est pas connu). Les axones olfactifs sont ensuite restreints à cette couche périphérique des nerfs olfactifs jusqu'à ce que la glomérulogénèse débute à E15 où ils s'enfonceront plus profondément dans le BO et formeront des connections synaptiques. Au cours de cette fenêtre de 4 jours, de nombreux

axones ont densifié la couche des nerfs olfactifs. Il apparait que cette fenêtre de 4 jours soit nécessaire à l'établissement de connections topographiques précises et appropriées dans le BO (Figure 3).

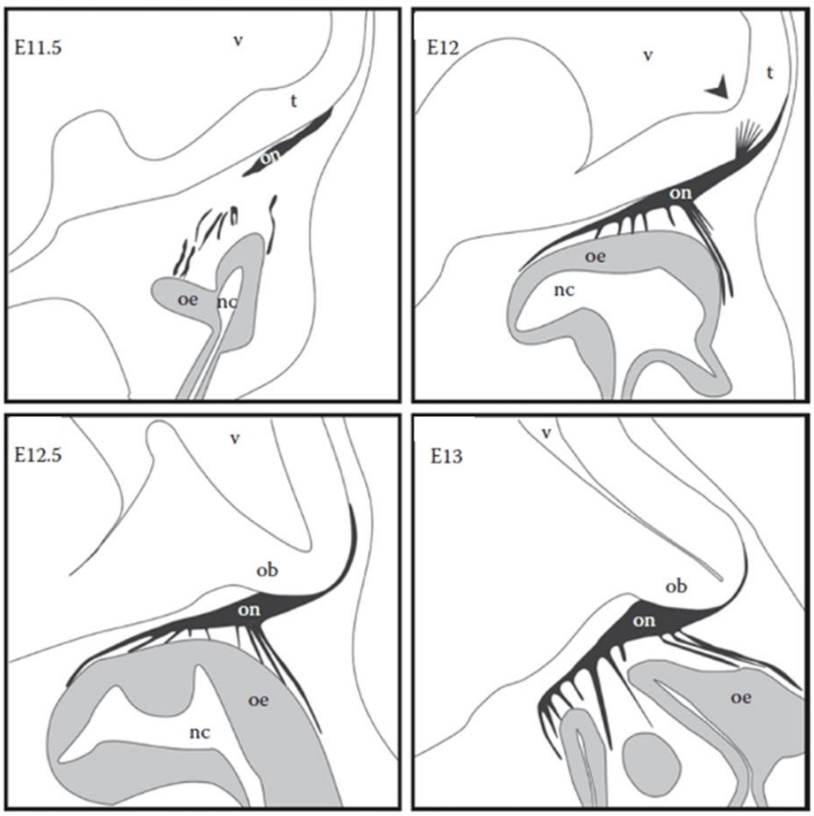


Figure 3 : Schéma représentant la formation du nerf et du bulbe olfactif de E11.5 à E13 lors du développement embryonnaire murin.
t, télencéphale; v, ventricules; on, nerf olfactif; nc, cavité nasale; ob, bulbe olfactif; oe, épithélium olfactif. La pointe de flèche pointe l'inflexion télencéphalique avant la formation distincte du bulbe olfactif. D'après (Treloar et al. 2011).

I.1.3 Le nerf voméronasal et le nervus terminalis

Ces deux nerfs sont associés anatomiquement au nerf olfactif. Les corps cellulaires du nerf voméronasal (ou nerf olfactif accessoire) sont situés dans l'organe voméronasal. Leurs axones établissent des synapses au niveau du bulbe olfactif accessoire, leurs dendrites portent les récepteurs des phéromones. Le système voméronasal joue un rôle important dans le comportement de reproduction chez l'animal. Chez l'homme, l'organe voméronasal est rudimentaire, on ne connait pas son rôle.

Le nerf terminal ou nervus terminalis est un nerf crânien présent dans le nez de la plupart des vertébrés dont l'homme de fonction inconnue. Les axones du nervus terminalis forment un plexus sur le septum nasal en position médiale par rapport aux nerfs olfactifs et voméronasal. Il s'en distingue par la présence de structures ganglionnaires le long de son trajet. Il traverse la lame criblée de l'ethmoïde en dedans du nerf olfactif. Dans sa partie

intracrânienne il longe la surface ventro-médiane du BO, où se situe la structure ganglionnaire la plus importante du nerf, le ganglion terminal, puis se divise en plusieurs branches qui pénètrent dans le cerveau juste en arrière des BO.

I.1.4 Développement du BO

Le BO se développe à partir d'une région prédeterminée du télencéphale rostral. Au cours du développement embryonnaire précoce, le télencéphale se pré-spécialise en différentes aires qui vont se développer en régions distinctes du cerveau. Macroscopiquement, le BO est une entité distincte à E12.5 comme une évagination du télencéphale rostral mais microscopiquement, des changements au sein du télencéphale rostral ont pu être identifiés avant E12 (Figure 3 et 4). La connexion des axones olfactifs pionniers dans la zone ventriculaire du télencéphale est suivie d'une inflexion du télencéphale rostral (Figure 3 et 4).

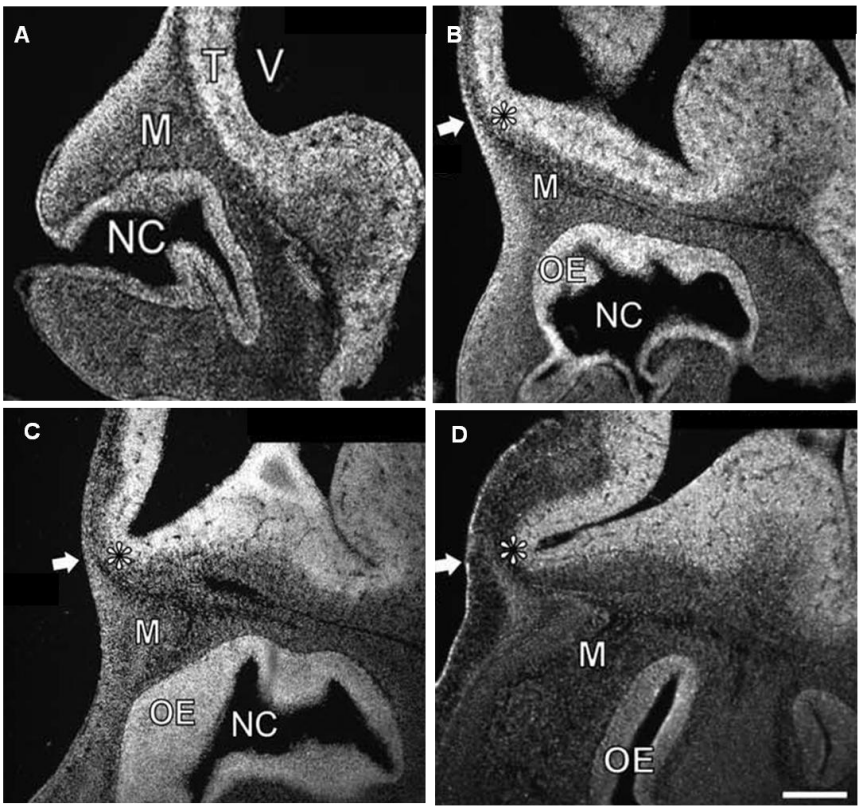


Figure 4 : Développement murin de la placode olfactive et du BO.
A : E11.5 ; B : E12 ; C : E12.5 ; D : E13. V: ventricule; T: télencéphale; M: mésenchyme; NC: cavité nasale; OE: épithélium olfactif. La flèche et l'astérisque indiquent l'aire présomptive du BO. D'après (Miller et al. 2010).

La cinétique du cycle cellulaire de l'aire présomptive du BO est significativement allongée par rapport au cortex adjacent 24h après l'arrivée des axones olfactifs pionniers (Gong and Shipley 1995). D'autre part, l'EO exerce un rôle trophique sur la croissance des dendrites des cellules mitrales et touffues du BO chez le rongeur, par le biais d'un facteur diffusible

non encore identifié (Tran et al. 2008). L'interruption des connections nerveuses entre l'EO et le BO a un quelconque moment de la vie entraine une dégénérescence du BO. Réciproquement, les BO ont une influence sur l'EO. Après bulbectomie, une dégénérescence axonale rétrograde des neurones matures se produit ainsi qu'une anomalie de maturation des neurones sensoriels olfactifs immatures dans l'EO (Verhaagen et al. 1990). Les cellules progénitrices des neurones olfactifs continuent de proliférer mais la durée de vie des neurones olfactifs est raccourcie (Carr and Farbman 1992; Schwob et al. 1992). D'ou l'hypothèse que le BO exercerait une action trophique sur les neurones sensoriels en voie de différenciation. Cependant, d'autres études plus récentes suggèrent que le BO se forme en l'absence de ces axones pénétrant dans la zone ventriculaire du télencéphale. En effet, l'étude des souris Pax-6 mutantes révèle qu'en l'absence d'EO, une structure similaire au BO se développe à partir du télencéphale rostral (Jimenez et al. 2000). De façon similaire, le BO des souris déficientes en Dlx5 se développe alors que les axones des nerfs olfactifs quittent l'EO mais n'atteignent pas le télencéphale (Levi et al. 2003; Long et al. 2003). La nature exacte du signal qui induit la formation du BO n'est pas encore identifiée mais de 2 formations indépendantes, la placode olfactive et le BO deviennent liés à mesure que le développement avance.

Les cellules mitrales et touffues ont été identifiées dans le BO dés E11. En développement, elles étendent leurs dendrites pour former la couche externe plexiforme présomptive du bulbe apposée sur la couche des neurones olfactifs. A E15, les axones olfactifs vont commencer à croitre vers cette couche cellulaire pour établir des synapses avec les cellules mitrales et touffues et former de futures structures glomérulaires délimitées par des cellules de Schwann. Chez les mammifères, une cellule mitrale donnée établie des connections avec un seul glomérule, mais chaque glomérule reçoit des afférences de plusieurs cellules mitrales. Dans chaque glomérule, plusieurs milliers de neurones sensoriels olfactifs établissent des synapses axono-dendritiques avec les cellules mitrales. Les axones des cellules mitrales fasciculent pour former les bandelettes olfactives (*lateral olfactory tract* ou LOT) qui se projettent sur le cortex piriforme et connectent ainsi les bulbes olfactifs aux aires olfactives du cortex cérébral. Les autres populations cellulaires principales composant le bulbe olfactif sont les interneurones, les cellules granulaires et les cellules périglomérulaires qui relient plusieurs glomérules entre eux. Ces cellules sont générées de façon prédominante au cours de la vie post-natale précoce. Elles naissent de la zone sous ventriculaire des ventricules latéraux et migrent vers le bulbe olfactif le long de la voie de migration rostrale appelée RMS.

I.2 Les cellules synthétisant la GnRH1

La GnRH a été isolée pour la première fois à partir d'hypothalamus de porc et de mouton (Amoss et al. 1971; Matsuo et al. 1971). Chez les vertébrés, 3 formes de GnRH ont été détectées au maximum codées par 3 gènes différents, *GnRH1* sur le chromosome 8 humain, *GnRH2* sur le chromosome 20 humain, *gnrh3* chez les poissons téléostéens. Ces 3 gènes paralogues sont issus de 2 duplications génomiques successives. GnRH2 est la forme la plus ancienne mais, au cours de l'évolution, le gène *préproGnRH2* et son récepteur ont été inactivés ou délétés de la plupart des génomes mammifères. Ainsi, un rôle physiologique de la GnRH2 chez les mammifères reste controversé. La GnRH1 contrôle la reproduction en se liant à son récepteur, GnRH1-R sur les cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure et en déclenchant la synthèse et la sécrétion de Luteinizing hormone (LH) et Follicle stimulating Hormone (FSH). Ces hormones hypophysaires agissent par la suite sur les gonades (Figure 5) et entrainent la production de stéroïdes sexuels.

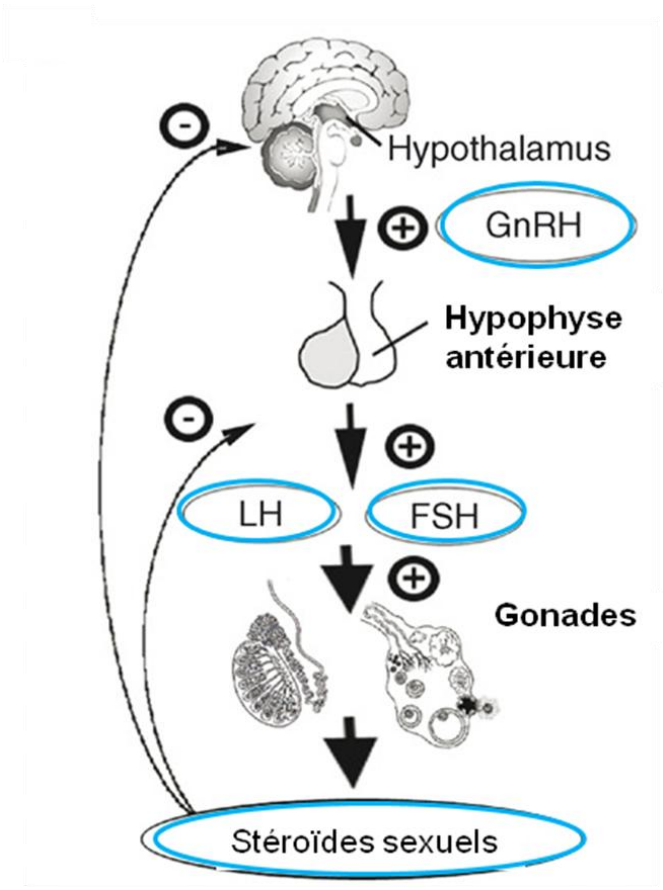


Figure 5 : Schéma de l'axe gonadotrope humain.
+ : stimulation, – : inhibition de sécrétion.

Chez les souris porteuses d'une mutation homozygote de *Gnrh1* (souris hpg), la fonction de reproduction est inhibée et elle est récupérée lors de la réintroduction dans les cellules

embryonnaires d'une copie normale de *Gnrh1* par thérapie génique (Mason et al. 1986). Cela met en évidence l'importance et le caractère unique de ce système. Chez les mammifères adultes, il y a entre 800 et 2000 cellules synthétisant la GnRH1 distribuées selon un continuum des BO jusqu'à l'hypothalamus. Indépendamment de leur localisation, ces cellules projettent leurs axones dans l'éminence médiane de l'hypothalamus où ils accèdent via des capillaires fenêtrées au système porte hypothalamo-hypophysaire.

I.2.1 Origine des cellules synthétisant la GnRH1

Les cellules synthétisant GnRH1 sont détectées pour la première fois au sein de l'organe voméronasal et de l'épithélium olfactif. La placode olfactive donnant naissance aux épithéliums respiratoire et olfactif, il est classiquement dit que les cellules synthétisant GnRH1 dérivent de la placode olfactive du fait de leur localisation initiale. Cependant, chez le poulet l'ablation de l'aire postérieure de la placode olfactive élimine l'EO mais épargne la population de cellules synthétisant GnRH1. A l'inverse, l'ablation de l'aire antérieure supprime les cellules synthétisant GnRH1 et celles de l'épithélium respiratoire mais conserve l'EO (Akutsu et al. 1992; Arai et al. 1994). Ces résultats suggèrent que les cellules synthétisant GnRH1 sont initialement associées à la région respiratoire de la placode olfactive et sont distinctes des progéniteurs de l'EO. L'absence d'expression de marqueurs de la lignée olfactive précoce dans les cellules synthétisant GnRH1 chez la souris est aussi un élément en faveur de la distinction initiale entre les cellules synthétisant GnRH1 et les progéniteurs olfactifs (Kramer and Wray 2000). Ainsi il est plus juste de parler d'origine de la placode nasale plutôt qu'olfactive des cellules synthétisant GnRH1.

I.2.2 Migration des cellules synthétisant GnRH1

Deux groupes ont indépendamment décrits la migration des cellules synthétisant GnRH1 de la placode nasal dans le système nerveux central (Schwanzel-Fukuda and Pfaff 1989; Wray et al. 1989).

Trajet

A E11 chez la souris, les cellules synthétisant la GnRH1 sont localisées dans l'épithélium de la partie médiane de la cavité nasale avant tout marquage dans le mésenchyme nasal (Schwanzel-Fukuda and Pfaff 1989). A E11.5, elles sont associées aux axones du nervus terminalis et du nerf voméronasal et elles le resteront dans leur migration au sein du mésenchyme nasal à E12 et E13 et au cours de leur passage de la lame criblée vers le télencéphale en développement vers E14 (Figure 6).

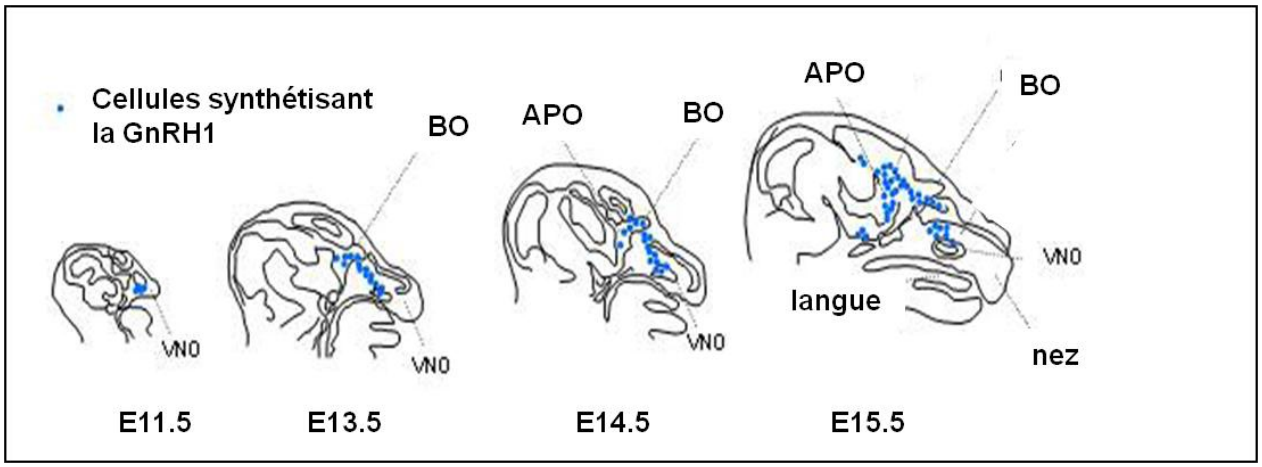


Figure 6 : Migration des cellules synthétisant la GnRH1 dans le cerveau d'embryon de souris.
Les cellules synthétisant la GnRH1 sont symbolisées en bleu. VNO : organe voméronasal, VNN : nerfs olfactifs/voméronasal/terminal, BO : bulbe olfactif, APO : aire préoptique de l'hypothalamus. D'après (Schwanzel-Fukuda and Pfaff 1989).

Les cellules synthétisant la GnRH1 bien que séparées au sein de l'épithélium de la cavité nasale, migrent dans le mésenchyme nasal en petits agrégats le long des nerfs voméronasaux et nervus terminalis. A la base du télencéphale, plusieurs branches nerveuses se forment. La première, composée probablement du nerf voméronasal et de cellules synthétisant la GnRH1 se dirige et se termine dans le bulbe olfactif accessoire. La seconde, également associée à des cellules synthétisant la GnRH1, suit un chemin central du nervus terminalis. Elle pénètre dans le cerveau juste en arrière des bulbes olfactifs, puis chemine à la face médiane des hémisphères cérébraux jusqu'à la région hypothalamique. A E16 chez la souris, la majorité des cellules synthétisant la GnRH1 ont atteint le cerveau mais la migration intracrânienne vers la partie caudale de l'hypothalamus continue jusqu'à au moins E18.

L'étude d'embryons humains a permis d'établir une route similaire des cellules synthétisant la GnRH1 (Schwanzel-Fukuda et al. 1996). A J28 de l'embryogénèse humaine, aucune immunodétection de GnRH1 n'est encore détectée et quelques cellules NCAM+ sont identifiées dans l'épithélium de la cavité nasale. Des cellules synthétisant la GnRH1 sont détectées à J42 de l'embryogénèse dans l'épithélium médian de la cavité nasale, au sein de cordées de cellules NCAM+ dans le mésenchyme nasal, dans les structures ganglionnaires du nervus terminalis, dans l'agrégats cellulaires sous le télencéphale rostral correspondant à la masse migratrice, dans les branches du nervus terminalis traversant la lame basale du télencéphale médian en arrière du BO en développement. A ce stade, quelques cellules étaient également identifiées dans le télencéphale médian à coté de l'entrée des nerfs voméronasal et terminalis. A J46, de plus nombreuses cellules exprimant GnRH1 sont vues entrant dans le télencéphale avec les axones du nervus terminalis. Ces cellules synthétisant

la GnRH1 ne sont jamais observées indépendamment de cellules et de fibres NCAM+ (axones des nerfs terminal, voméronasal et des neurones olfactifs) et de nombreux vaisseaux formant un support de migration.

Type de migration

Les neurones du système nerveux central utilisent deux stratégies principales de migration, radiale ou tangentielle. La migration radiale se fait selon un trajet perpendiculaire à la surface des ventricules et utilise la glie radiaire. La migration tangentielle se fait selon un trajet parallèle à la surface des ventricules et n'utilise pas de support de migration. Les cellules synthétisant la GnRH1 migrent en association avec un groupe d'axones olfactifs. Bien qu'elle ne soit pas sur de la glie radiaire, leurs migrations semblent plus proches d'un mouvement tangentiel que d'un mouvement radial. Ainsi, les cellules synthétisant la GnRH1 présentent des caractéristiques des 2 catégories utilisées couramment pour décrire la migration des neurones du système nerveux central, ce qui les rend unique.

Mouvement cellulaire

Les cellules synthétisant la GnRH1 migrent comme les neurones du système nerveux central selon 3 étapes synchronisées : Extension d'un pseudopode, déplacement antérieur du noyau (ou nucléokinese), rétraction de l'adhérence postérieure. Leur vitesse est similaire à celle de neurones corticaux utilisant la glie radiaire (13 à 20 µm/h). Ainsi à la fois le mouvement et la vitesse des cellules synthétisant la GnRH1 sont proches des neurones en migration du système nerveux central dépendant de molécules extracellulaires : sémaphorines, prokinéticines ; des récepteurs tyrosine kinase/cytokines : Ephrines, HGF ; des chémokines : SDF1 ; des neurotransmetteurs : cholécystokinine, GnRH ; des facteurs de classe inconnue : NELF.

I.3 Le syndrome de Kallmann associe une anomalie de développement du système olfactif et un défaut de migration des cellules synthétisant la GnRH1

Le syndrome de Kallmann est l'illustration physiopathologique de la relation embryologique au cours du développement entre le système des cellules synthétisant la GnRH1 et le système olfactif. L'examen de deux fœtus KS, l'un porteur d'une large délétion emportant *KAL1* et l'autre d'une mutation non sens p.R257X de *KAL1*, a montré l'absence de cellules synthétisant la GnRH1 détectable dans le cerveau mais anormalement localisées entre la surface du système nerveux central et la face dorsale de la lame criblée juste accolées aux méninges, dans un enchevêtrement d'axones et de structures ganglionnaires du nervus terminalis (Schwanzel-Fukuda et al. 1989; Teixeira et al. 2010). Les nerfs olfactifs présents dans la cavité nasale avaient traversé la lame criblée mais s'étaient terminés en névromes de part et d'autre de la ligne médiane. Les bulbes olfactifs étaient absents. Cette

observation suggérait que le développement de la placode olfactive, des nerfs olfactifs, voméronasal et terminalis ainsi que celui des cellules synthétisant la GnRH1 était normal jusqu'à un certain moment. Toutes ces structures parvenaient à atteindre la surface dorsale de la lame criblée mais pas à pénétrer le cerveau. Il a été décrit que de façon générale, tous les fœtus arhinencéphales (c'est-à-dire avec absence des bulbes olfactifs) à savoir ceux atteints de syndrome CHARGE, d'une trisomie 13 et d'une trisomie 18 n'ont pas de cellules synthétisant la GnRH1 au niveau de l'hypothalamus (Teixeira et al. 2010). Chez les fœtus arhinencéphales, aucune cellule synthétisant la GnRH1 ou quelques cellules uniquement ont été détectées au sein de l'aire préoptique (Figure 7). Ces observations ont été faites à partir de fœtus de 18 et 25 semaines, stade auquel les BO sont formés. Elles ont permis de définir une nouvelle séquence foetopathologique appelée séquence olfacto-génitale où l'absence de migration des cellules synthétisant la GnRH1 est secondaire à un défaut primaire de développement des structures olfactives ceux de façon isolée, comme dans le syndrome de Kallmann, ou au sein d'une maladie pléiotrope comme le syndrome CHARGE, la trisomie 13 ou la trisomie 18 (Teixeira et al. 2010).

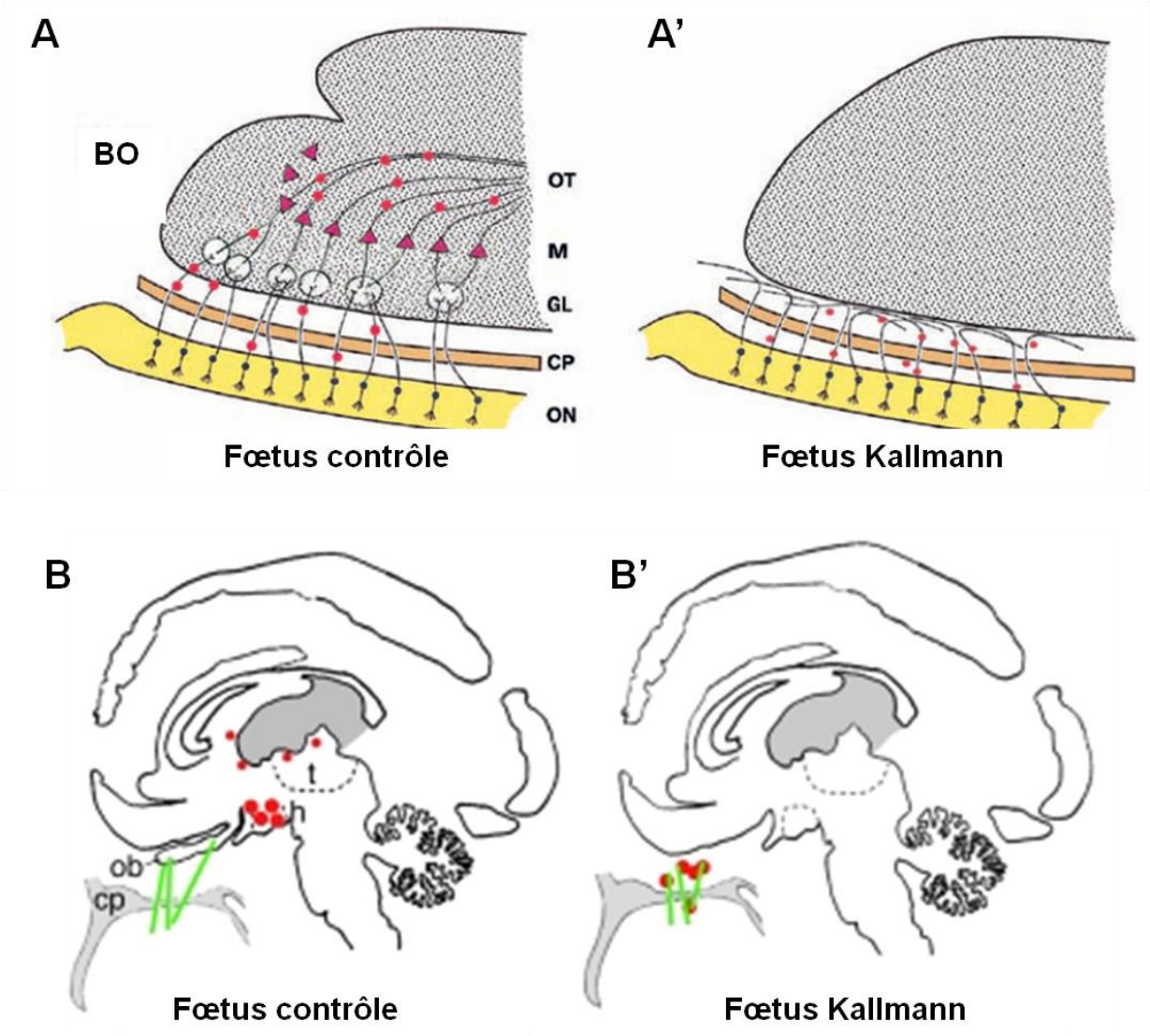


Figure 7 : Schéma comparant le système olfactif et la distribution des neurones synthétisant la GnRH1 chez un fœtus contrôle et un fœtus Kallmann de 25 semaines. A et A': Système olfactif périphérique et télencéphale d'un fœtus contrôle et d'un fœtus Kallmann. B et B': Distribution des cellules synthétisant la GnRH1 dans l'hypothalamus et le télencéphale d'un fœtus normal et d'un fœtus Kallmann. Les cellules synthétisant la GnRH1 sont symbolisées par des points rouge. Les lignes vertes représentent les axones des nerfs olfactifs et terminal.

ob: bulbe olfactif; cp: lame criblée de l'ethmoide; h: hypothalamus; t: thalamus; GL: couche glomérulaire du bulbe; M: cellules mitrales; OT: tractus olfactif. D'après (Teixeira et al. 2010).

II Signes cliniques du syndrome de Kallmann

II.1 Signes cardinaux

Par définition, le KS est l'association d'un HH et d'une altération de l'odorat, hyposmie ou anosmie. L'anomalie de migration des neurones synthétisant la GnRH1 a pour conséquence l'absence de stimulation des gonadotrophines hypophysaires par la GnRH1 et l'absence de sécrétion des stéroïdes sexuels entrainant une absence de puberté spontanée. L'altération de l'odorat est secondaire à une anomalie de la formation des bulbes olfactifs.
La prévalence de la maladie est estimée à 1/8000 chez les garçons (Fromantin et al. 1973). La prévalence féminine a été initialement estimée à 5 à 7 fois moins que chez les garçons (Jones and Kemmann 1976). On trouve un rapport homme/femme entre 1.5 et 5.7 dans les différentes séries (Tableau 1) (Abujbara et al. 2004; Kaplan et al. 2010; Laitinen et al. 2011; Lieblich et al. 1982; Quinton et al. 2001; Sato et al. 2004). Il est possible que cette prévalence féminine soit sous-estimée du fait d'un diagnostic féminin moins visible (cf. Introduction chapitre II.1.1). L'âge au diagnostic est extrêmement variable (4 à 61 ans dans la littérature) et, en période pré pubertaire, seuls des garçons ont été diagnostiqués.

II.1.1 L'hypogonadisme hypogonadotrope

En période néonatale, une cryptorchidie uni ou bilatérale peut être présente dans 28 à 73% des cas masculins rapportés. Un micropénis peut également être présent dans 50 à 65% des cas rapportés (Tableau 1). Mais surtout, le phénotype à la naissance, chez le nouveau-né masculin, peut être strictement normal. Il n'existe pas de signe clinique féminin à la naissance. Le diagnostic biologique peut être fait en période néonatale. A 1-2 semaines de vie, une sécrétion de pulses de GnRH1 a normalement lieu, suivie d'une augmentation de LH, FSH, appelée minipuberté. Elle dure, chez le garçon, jusqu'à 6 mois de vie avec un pic entre 4 et 10 semaines de vie et est associée à une sécrétion de testostérone. Chez la fille, cette augmentation de FSH et LH dure 2 à 3 ans et est inconstamment associée à une élévation du taux d'estradiol (Grumbach 2005). Au cours de cette courte période l'absence d'élévation de ces hormones permet le diagnostic de l'hypogonadisme. A la puberté, l'absence d'apparition des caractères sexuels secondaires (soit chez le garçon, absence d'augmentation du volume testiculaire à l'âge de 14 ans et chez la fille, absence de développement mammaire à 13 ans ou absence de règle à 15 ans) constitue le mode de révélation principal de la maladie. De façon moins classique et de description plus récente, le phénotype gonadotrope peut être moins sévère. Un retard pubertaire peut être l'unique signe de l'atteinte gonadotrope avec l'apparition tardive d'une puberté complète (Dode et al. 2003)

ou une puberté partielle marquée par un développement incomplet testiculaire (Pitteloud et al. 2006b), par la présence d'un développement mammaire isolé sans ménarche. A l'âge adulte, de façon plus rare, des cas d'HH acquis ont été décrits après une puberté normale secondaire à un KS et des HH réversibles ont été rapportés (Bauman 1986; Quinton et al. 1999). La prévalence réelle de ces cas de Kallmann réversible n'est pas connue, elle a été estimée à 5% (Quinton et al. 1999). Le déficit gonadotrope est confirmé lorsqu'il existe un taux bas d'hormones sexuelles associé à un taux normal ou bas de FSH, LH. Une baisse de la concentration sanguine d'inhibine B peut être objectivée dans les déficits gonadotropes sévères (Coutant et al. 2010). Le test de stimulation à la GnRH est encore utilisé quoique son intérêt diagnostic soit de plus en plus remis en cause. L'amélioration des techniques de dosages des gonadotrophines ne le rendent plus nécessaire à la distinction entre hypogonadisme hypogonadotrope et hypergonadotrope. Il ne permet pas de différencier le siège hypothalamique ou hypophysaire d'un déficit gonadotrope : dans les atteintes hypothalamiques sévères, les gonadotrophines peuvent ne pas augmenter (test négatif) et dans les atteintes hypophysaires partielles, elles peuvent s'élever (test positif). En revanche, ce test de stimulation à la GnRH peut évaluer la sévérité du déficit gonadotrope.

II.1.2 Le déficit olfactif

Le déficit olfactif devrait être présent chez tous les patients KS de façon plus ou moins sévère dans un spectre entre l'hyposmie et l'anosmie. Il est évalué par un questionnaire détaillé ainsi que par des tests d'olfactométrie. Elle utilise des produits odorants purs pour éviter une stimulation trigéminale et distingue le seuil de détection des odeurs de celui de leurs identifications. Il existe une grande variabilité interindividuelle, les résultats sont donc à comparer à ceux d'une cohorte de sujets normaux (Eloit and Trotier 1994). L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) permet de visualiser une aplasie ou une hypoplasie des BO, mais aucune anomalie n'a été détectée par cette technique chez environ 10% des patients ayant un déficit olfactif clinique (Quinton et al. 1996) (Figure 8). L'IRM des BO est l'examen le plus fiable chez les jeunes enfants, et les individus ayant une fente labiale/palatine ou un retard mental chez lesquels les tests olfactifs sont de réalisation difficile et d'interprétation délicate.

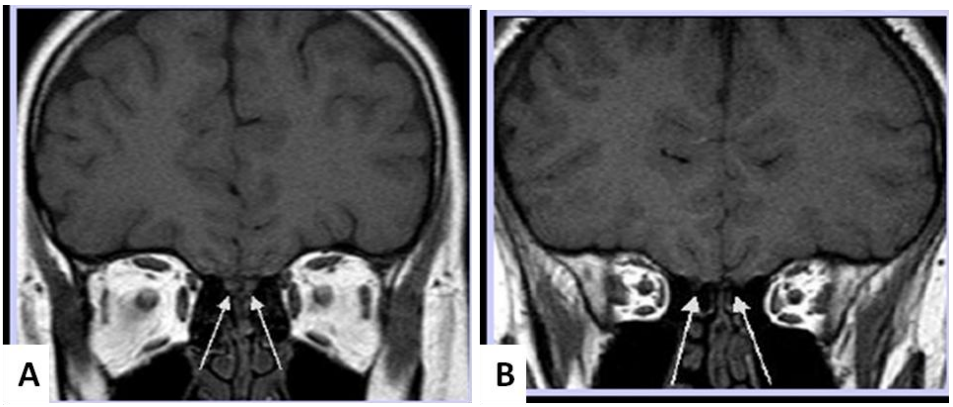


Figure 8: IRM des bulbes olfactifs normale et d'un patient KS.
A : IRM normale, les bulbes olfactifs sont pointés par les flèches. B : Agénésie des bulbes olfactifs.

Le degré d'hypogonadisme et de déficit olfactif peut varier considérablement dans une famille atteinte (Dode et al. 2003; Pitteloud et al. 2005). Cette variabilité clinique des signes cardinaux est présente exclusivement dans certaines formes génétiques de la maladie (Salenave et al. 2008) (cf. Introduction chapitre corrélation phénotype génotype III.3.1).

II.2 Signes cliniques associés

La fréquence de ces signes associés varie selon les séries (Tableau 1) et selon les formes génétiques de la maladie (cf. Introduction chapitre corrélation phénotype génotype III.3.1).

II.2.1 Symptômes neurologiques

Il peut s'associer au KS des syncinésies controlatérales d'imitation appelées « mouvements en miroir ». Ils semblent secondaires à un mécanisme complexe associant des anomalies de la substance blanche au sein des voies motrices primaires (tractus cortico-spinal) et dans d'autres régions dont les aires associatives (lobes frontaux) ou le corps calleux (Koenigkam-Santos et al. 2010). Une surdité dont le mécanisme (de transmission, de perception ou mixte) varie selon les formes génétiques a été observée.

II.2.2 Atteinte de la ligne médiane

Les anomalies dentaires sont variables, le nombre de dents manquantes pouvant aller de une à neuf (Bailleul-Forestier et al. 2010), la dent la plus fréquemment manquante est une incisive mandibulaire latérale. Les anomalies palatines sont également communes à différentes formes génétiques de la maladie bien que leur sévérité varie entre un palais arqué et la présence de fentes palatines, parfois sévères (Albuisson et al. 2005; Dodé et al. 2007; Dodé et al. 2003; Pitteloud et al. 2006b; Trarbach et al. 2006a).

II.2.3 Atteinte rénale

Différentes anomalies rénales ont été mises en évidence chez des patients KS avec principalement des agénésies rénales. Les conséquences de ces anomalies rénales ont été étudiées : Une étude s'est intéressée à la morbidité rénale de patients KS ayant une agénésie rénale (Duke et al. 1998), certains patients développent une protéinurie modérée associée à une hypertension légère à modérée.

Etude de séries de patients KS	1	2	3	4	5
Nombre de patients (H/F)	23 (14/9)	114 (97/17)	32 (26/6)	28 (25/3)	30 (25/5)
Cryptorchidie (%)	42.8	70	73	ND	28
Micropénis (%)	50	ND	65	ND	50
Anomalies rénales (%)	6.2	15	45	28.6	3.3
Syncinésies (%)	ND	31	50	14.3	6.6
Fente labiale ou palatine (%)	13	4	ND	7.1	10
Perte de l'audition (%)	25	8	13.7	7.1	6.6
Agénésie dentaire (%)	ND	ND	ND	3.6	6.6

Tableau 1: Signes associés chez des patients KS dans 5 séries de la littérature.
H, homme ; F, femme ; ND, non disponible. 1 : Lieblich et al 1982, 2 : Quinton et al 2001, 3 : Abujbara et al 2004, 4 : Sato et al 2004, 5 : Laitinen et al 2011.

II.3 Diagnostics différentiels

Un HH peut être soit congénital soit acquis. Les causes acquises sont dominées par les tumeurs hypothalamo-hypophysaires et sont hors de mon propos. Les causes congénitales sont dites isolées ou syndromiques (Figure 9). Au sein des causes congénitales, on distingue 2 maladies selon la présence ou l'absence d'un déficit de l'olfaction : le KS et l'HH congénital normosmique. De nombreux syndromes comprennent un HH en association avec des anomalies multiviscérales : ophtalmologiques (Bardet Biedl), neurologiques (Laurence Moon), métaboliques (anomalie de signalisation du récepteur de la leptine), des endocrinopathies (hypoplasie congénitale des surrénales) mais un KS n'a été décrit qu'au sein du syndrome CHARGE qui devient ainsi un diagnostic différentiel de KS.

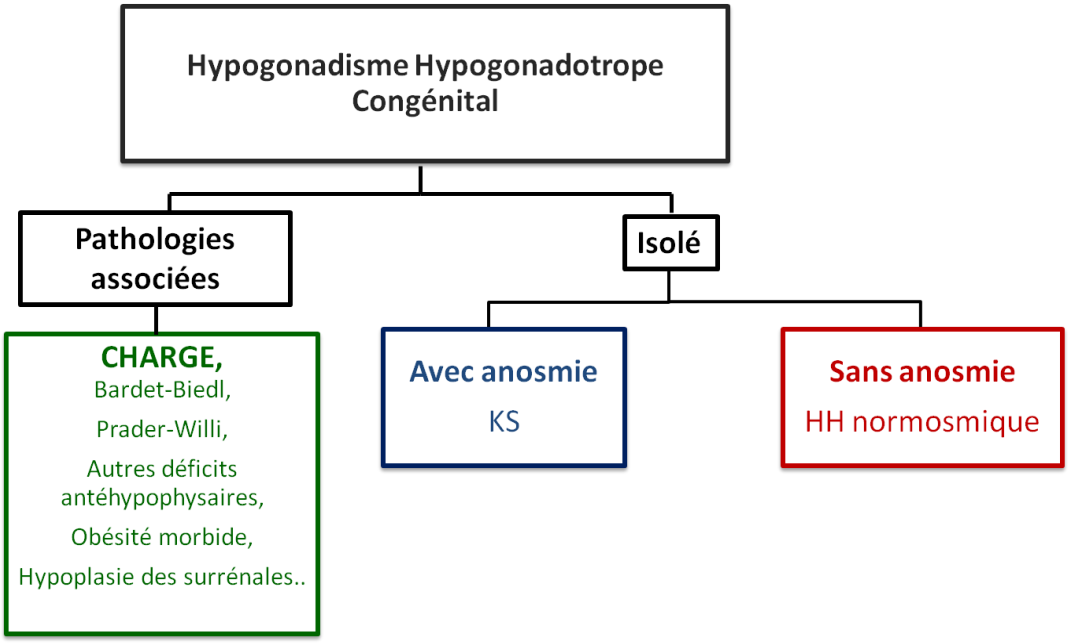


Figure 9: Classification étiologique des HH congénitaux.

II.3.1 L'HH congénital normosmique

Cliniquement, l'absence de trouble de l'odorat à l'interrogatoire oriente le diagnostic mais seule une olfactométrie normale et l'absence d'anomalie du tractus olfactif à l'IRM des bulbes olfactifs confirme le diagnostic. Aucun signe clinique associé à l'HH congénital normosmique n'a été décrit. Les modes de transmission semblent être autosomique récessif et/ou digénique voire oligogénique. A l'heure actuelle, 6 gènes dont les mutations sont responsables de la maladie ont été identifiés *GnRHR, GnRH1, Kiss1R, Kiss1, TACR3, TAC3,* pour revue (Brioude et al. 2010).

II.3.2 Le syndrome CHARGE

Le syndrome CHARGE peut associer des anomalies congénitales variables (OMIM 214800), c'est une maladie très sévère touchant le pronostic fonctionnel et vital (espérance de vie de 5 jours à 46 ans). CHARGE est un acronyme pour **C**olobome, **H**eart defects (anomalies cardiaques), **A**trésie choanale, **R**etard de croissance et de développement, **G**énitale hypoplasie et **E**ar anomalies. Des exemples caractéristiques des anomalies de l'oreille externe présentes dans le CHARGE sont sur la Figure 10.

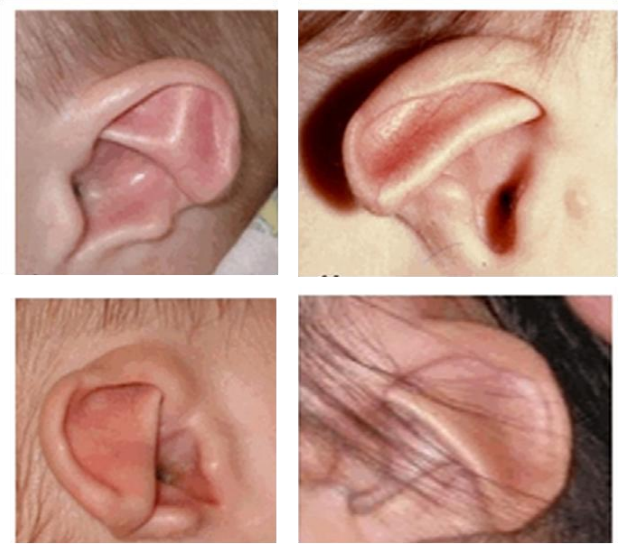


Figure 10: Exemples d'anomalies caractéristiques des oreilles de syndrome CHARGE. D'après (Kim and Layman 2011).

Des critères cliniques ont été établis pour le diagnostic de syndrome CHARGE résumés dans le Tableau 2. Par ailleurs, environ 80% des patients atteints de ce syndrome présente les signes caractéristiques du KS, un HH et une anomalie de développement des bulbes olfactifs (Bergman et al. 2011a; Blustajn et al. 2008; Chalouhi et al. 2005; Pinto et al. 2005). Les anomalies de l'oreille externe, d'un nerf crânien et des canaux semi-circulaires sont les plus fréquemment mises en évidence chez les patients ayant un syndrome de CHARGE (91 à 97%, 99%, 94 à 98% respectivement) (Bergman et al. 2011b; Zentner et al. 2010). La base moléculaire de ce syndrome a été en partie élucidée en 2004 par Vissers et al qui ont identifiés des mutations de *CHD7* (Vissers et al. 2004) (cf Introduction Chapitre III.2.4).

	Critères majeurs	Critères mineurs	Règles d'inclusion
Selon Blake actualisé	1. Colobome ou microphtalmie 2. Atrésie choanale ou sténose ou fente palatine 3. Anomalies de l'oreille externe 4. Dysfonction d'un nerf crânien	1. Malformations cardiovasculaires 2. Defects trachéo-oesophagien 3. Hypoplasie génitale ou puberté retardée 4. Fente labiale et/ou palatine 5. Retard de développement 6. Retard de croissance 7. Anomalies faciales	CHARGE typique= 4 critères majeurs ou 3 majeurs et 3 mineurs
Selon Verloes	1. Colobome 2. Atrésie choanale 3. Hypoplasie des canaux semi-circulaires	1. Malformation cardiaque ou oesophagienne 2. Malformation de l'oreille moyenne ou externe 3. Dysfonction rhombencéphalique dont surdité 4. Dysfonction hypothalamo-hypophysaire 5. Retard mental	CHARGE typique= 3 critères majeurs ou 2 majeurs et 2 mineurs CHARGE partiel= 2 critères majeurs et 1 mineur CHARGE atypique= 2 critères majeurs et 0 mineur ou 1 critère majeur et 3 mineurs.

Tableau 2: Critères cliniques de diagnostic de syndrome CHARGE
Selon (Blake et al. 1998), actualisé Lalani, GeneReviews et selon (Verloes 2005).

III Génétique du syndrome de Kallmann

III.1 Difficultés de caractérisation de gènes KS

Dans les formes familiales, plusieurs modes de transmission génétique de KS ont été décrits: récessif lié au chromosome X (OMIM 308700), autosomique dominant (OMIM 147950), autosomique récessif (OMIM 244200). Cependant, la plupart des cas sont, en apparence, sporadiques. A cette variabilité génétique, s'ajoute une grande hétérogénéïté phenotypique : chez les patients KS, les membres atteints d'une même famille peuvent présenter des degrès divers d'hypogonadisme ou d'anosmie, y compris dans le cas de jumeaux monozygotes (Hipkin *et al.*, 1990). Enfin, les cas familiaux sont le plus souvent dans des familles de petite taille car KS affecte la fertilité. Ce fait, ainsi que l'hétérogénéité génétique et, surtout, la pénétrance incomplète de la maladie, rendent très difficiles les analyses de liaison habituellement utilisées pour identifier les gènes responsables de maladie. Plusieurs types d'approches sont donc utilisés pour tenter de localiser et identifier des gènes dont les mutations sont responsables de KS : Les deux premiers, *KAL1* et *FGFR1*, l'ont été en utilisant la même approche de clonage positionnel, fondée sur l'analyse de rares cas de délétions du chromosome X (région Xp22.3) pour *KAL1* (Franco et al. 1991; Legouis et al. 1991) et du chromosome 8 (région 8p11-p12) pour *FGFR1* (Dode et al. 2003) associées à la présence d'un syndrome « de gènes contigus ». Les deux suivants, *PROK2* et *PROKR2* ont été découverts par une stratégie gènes candidats, les modèles murins invalidés pour ces gènes présentaient un phénotype KS. L'étude de lignées de patients KS porteurs de translocations chromosomiques, l'approche par gènes candidats ont été les autres méthodes de caractérisation de gènes KS.

III.2 Gènes KS : Fonction

A ce jour, 8 gènes KS ont été identifiés mais aucune mutation dans l'un de ses 8 gènes n'est mise en évidence chez environ 60 à 65% des patients.

III.2.1 *KAL1* code pour l'anosmine 1

KAL1 a été identifié simultanément par 2 groupes en 1991 en utilisant une approche de clonage positionnel fondée sur l'analyse de rares cas de délétions de la région Xp22.3 (Franco et al. 1991; Legouis et al. 1991). Il s'agissait du premier gène responsable de déficit en GnRH chez l'homme. *KAL1* est un gène de 14 exons qui code pour une glycoprotéine,

l'anosmine-1 de 680 acides aminés et d'environ 95 kDA. L'anosmine-1 est une protéine de la matrice extra cellulaire comprenant un domaine riche en cystéine à sa partie N-terminale suivi d'un domaine WAP analogue a celui de la protéine du petit lait (whey acidic protein (WAP)), également présent dans certaines protéines inhibitrices de protéases à serine lié à 4 domaines fibronectine-III et une région C-terminale riche en histidine (Figure 11).



Figure 11: Structure de l'anosmine-1.
SP, peptide signal ; CR, région riche en cystéine ; WAP, Whey acidic protein ; FnIII, domaine fibronectine III ; H, région riche en histidine.

L'étude histopathologique de 2 fœtus âgé de 19 et 25 semaines, l'un avec avec une très grande délétion incluant *KAL1*, l'autre une mutation non sens R257X de *KAL1*, a révélé l'absence de bulbe olfactif et une localisation anormale des neurones synthétisant la GnRH1 avec leur accumulation entre la lame criblée et le télencéphale (Schwanzel-Fukuda et al. 1989; Teixeira et al. 2010) au sein d'axones des neurones olfactifs. Ces observations suggéraient l'implication de l'anosmine-1 dans la migration finale des neurones synthétisant la GnRH1 et celle des axones des neurones olfactifs. En revanche, cela ne permet pas d'en déduire le défaut primaire, si les axones des nerfs olfactifs n'ont pas atteint le télencéphale ou s'ils ont dégénéré secondairement après un contact initial.

Il n'existe pas de modèle murin déficitaire *Kal1* car l'orthologue murin de *KAL1* n'a pas été identifié à ce jour. Chez l'homme, l'anosmine-1 est exprimée dans l'aire présomptive du BO dés la 5ème semaine de vie embryonnaire (Tableau 3) (Figure 18) (Hardelin et al. 1999). Ainsi, l'anosmine-1 semble jouer un rôle dans la différenciation initiale du BO et l'innervation terminale des neurones olfactifs. L'interaction de l'anosmine-1 avec la membrane cellulaire est dépendante de la présence des héparanes sulfates protéoglycanes (HS) auxquels la protéine se lie. *In vivo*, l'importance de cette interaction a été démontrée par un modèle de nématode transgénique surexprimant l'orthologue de *KAL1* dans certains de ses neurones. Le phénotype de branchement axonal anormal chez ces vers transgéniques n'est plus observé chez des animaux mutants déficients en héparane 6O-sulfotransférase ou en C5-épimerase, deux enzymes impliquées dans la synthèse des chaines polysaccharidiques des HS (Bulow et al. 2002).

L'anosmine-1 pourrait *via* son interaction aux HS stabiliser le complexe FGF/FGFR1/HS. Enfin, des effets chémotactiques de l'anosmine 1 sur la croissance axonale et la migration neuronale ont été observés *in vitro* (Soussi-Yanicostas et al. 2002).

III.2.2 *FGFR1* et *FGF8*

En 2003, *FGFR1* a été identifié grâce à 2 malades KS présentant un syndrome de gènes contigus et ayant des délétions chevauchantes sur le chromosome 8p11-12 (Dode et al. 2003). La fréquence des mutations de *FGFR1* est d'environ 10% des cas de KS. *FGFR1* code pour l'un des 4 récepteurs aux FGFs, récepteurs tyrosine kinase. Les domaines immunoglobuline like 2 (D2) et 3 (D3) fixent le ligand. L'épissage alternatif de la partie C-terminale du 3ème domaine module la spécificité de liaison au ligand en générant 2 isoformes FGFR1-IIIb et FGFR1-IIIc. L'isoforme IIIb codée par l'exon 8a est exprimée dans les tissus épithéliaux, l'isoforme IIIc codée par l'exon 8b est spécifique du tissu mésenchymateux. La présence de mutations ponctuelles dans l'exon 8B chez certains patients KS avec ou sans fente palatine, indique que l'isoforme FGFR1-IIIc est impliquée dans la morphogénèse des bulbes olfactifs et du palais (Pitteloud *et al.*, 2006b; Trarbach *et al.*, 2006; Dode *et al.*, 2007). L'activation du récepteur nécessite sa dimérisation, médiée par la liaison à 2 FGFs et aux HS, entrainant l'autophosphorylation du domaine tyrosine kinase. Cela active une cascade de signalisation, l'activation des voies Ras/Mitogen-activated protein kinase (MAPK) et Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/AKT et phospolipase C gamma PLCγ (Mohammadi et al. 2005) (Figure 12).

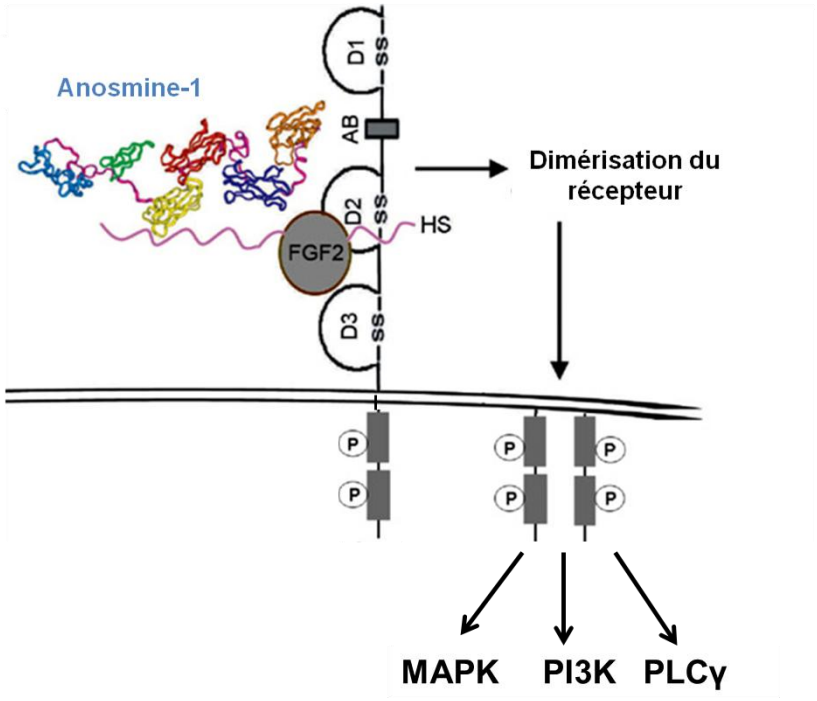


Figure 12: Schéma de l'activation de FGFR1.
HS : héparane sulfate, AB : boite acide, D1 à 3 : 1er à 3ème domaine immunoglobuline like.

Durant le développement, FGFR1 a un rôle crucial au cours de la gastrulation, la spécification des organes. Le modèle murin *Fgfr1*$^{-/-}$ ne survit pas au stade de gastrulation.

L'expression de Fgfr1 est quasi ubiquitaire. Au cours de l'embryogénèse du cerveau, Fgfr1 est exprimé au niveau du télencéphale, du mésenchyme nasal et de façon moindre de l'EO (Figure 18 et Tableau 3). Le rôle de FGFR1 au cours du développement du système olfactif a été mis en évidence dans différents modèles murins. Lors de l'invalidation de *Fgfr1* (délétion des exons 8-15) dans le télencéphale, les neurones olfactifs atteignent le BO mais, en l'absence de signal fgf, les cellules du futur BO ne se différencient pas et continuent de se multiplier (Figure 13) sans donner naissance à un bulbe olfactif (Hebert et al. 2003) (Figure 18).

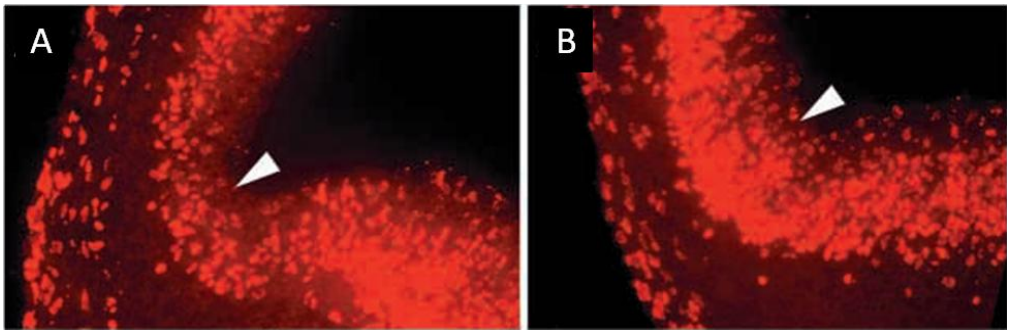


Figure 13: Incorporation de BrdU sur le site du développement normal du bulbe olfactif à E12.5 chez la souris.
A : souris contrôle, B : souris avec invalidation télencéphalique de *Fgfr1*. La flèche pointe le lieu de développement du futur bulbe olfactif. D'après (Hebert et al. 2003).

D'autre part, des souris transgéniques où l'expression de Fgfr1 a été diminuée par le biais d'un transgène dominant négatif, dans les neurones synthétisant la GnRH1, ont une diminution du nombre de ces neurones dans l'hypothalamus sans hypogonadisme mais avec une puberté retardée (Tsai et al. 2005). Ces études révèlent un rôle de FGFR1 dans la formation du système olfactif et dans l'ontogénie des neurones synthétisant la GnRH1.
L'implication de mutations de *KAL1* et *FGFR1* dans la pathogénèse du KS ainsi que leurs liaisons communes aux HS suggèrent que ces protéines interagissent dans un complexe de signalisation. En effet, une augmentation des effets mitogènes de l'isoforme FGFR1-IIIc dans des cellules lymphoides en présence de FGF2 a été démontrée par l'anosmine-1 (Gonzalez-Martinez et al. 2004). Le mécanisme précis de leur coopération n'est pas connu à ce jour.
Plus récemment, *FGF8* a été impliqué dans la pathogénèse du KS (Falardeau et al. 2008) de façon très rare actuellement (1 à 2% des patients). Une mutation L342S hétérozygote de *FGFR1* dentifiée chez un patient KS n'entraine pas de déficit de signalisation après stimulation FGF2. Une modélisation structurale du complexe FGF8-FGFR1 a permis de montrer l'importance de la Leucine 342 dans l'interaction avec FGF8 (Pitteloud et al. 2007a). Secondairement, la recherche de mutations de *FGF8* dans une cohorte de malades ayant un HH a permis l'identification de mutations rares à l'état homozygote ou hétérozygote (Falardeau et al. 2008). Fgf8 est exprimé très tôt au cours de l'embryogénèse murine dans la

placode olfactive en formation puis dans l'EO (Figure 18). Les souris invalidées pour *Fgf8* ont une léthalité précoce embryonnaire. L'étude de souris hypomorphes *Fgf8* a mis en évidence une hypoplasie des BO et des anomalies morphologiques de l'EO (Chung et al. 2008) (Figure 19). Les neurones synthétisant la GnRH1 sont absents de l'hypothalamus mais aussi de la région nasale sans signe d'apoptose suggérant que Fgf8 est nécessaire à la différenciation de ces neurones (Figure 20).

III.2.3 La prokinéticine 2, *PROK2* et son récepteur, *PROKR2*

PROKR2 appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G à 7 domaines transmembranaires. PROK2, l'un de ses 2 ligands est une petite protéine sécrétée contenant environ 80 acides aminés. Les 2 souris invalidées pour ces gènes, *prok2*$^{-/-}$ et *prokr2*$^{-/-}$ ont des anomalies de la morphogénèse des BO ; une hypoplasie des BO associée à des anomalies architecturales et une asymétrie des BO dans 50% des cas pour la souris *prok2*$^{-/-}$, une hypoplasie des BO constatée dés E16.5 chez toutes les souris *prokr2*$^{-/-}$ (Matsumoto et al. 2006; Ng et al. 2005) (Figure 19). Il s'y associe une anomalie de développement de leurs organes reproducteurs secondaire à une diminution du nombre de neurones synthétisant la GnRH1 dans l'hypothalamus (Figure 20). Au cours de l'embryogénèse, Prok2 est exprimé dans les BO et l'EO, Prokr2 n'est pas identifié dans le BO mais dans l'EO et dans le mésenchyme (Tableau 3 et Figure 18). Des mutations principalement faux sens de *PROK2* et *PROKR2* ont été mises en évidence chez environ 10% (2 et 8% respectivement) des patients KS (Dode et al. 2006).

La découverte des prokinéticines est issue de l'étude de l'activité biologique des protéines contenues dans les venins de serpent et les sécrétions cutanées des amphibiens. Les orthologues chez les mammifères, PROK1 et PROK2 furent ensuite identifiés en 2001 pour leur capacité à contracter les cellules musculaires lisses du tractus gastro-intestinal, fonction qui est à l'origine de leur dénomination même si elle est actuellement controversée. Elles partagent un motif extrêmement conservé dans leur partie N-terminale, constitué des six premiers acides aminés (AVITGA), ainsi que dix résidus cystéines formant cinq ponts disulfures. Ce motif AVITGA a un rôle déterminant dans leur fonction biologique, toute modification de ce motif entrainant une perte d'activité de la protéine (Bullock et al. 2004). La structure de PROKR2 montre que c'est un récepteur principalement couplé à Gq.

Les fonctions biologiques attribuées aux couples prokinéticines/prokinéticines récepteurs sont multiples et diverses (Maldonado-Perez et al. 2007; Zhou 2006). Ils influencent ainsi des processus divers tels que l'angiogénèse, l'hématopoïèse, la réponse immunitaire, la survie neuronale, la perception de la douleur, la reproduction, les rythmes circadiens et la prise alimentaire, l'implication des prokinéticines dans ces 3 derniers processus est détaillée ci-après. En plus de leur rôle sur la migration des neurones à GnRH, les prokinéticines ont

aussi un rôle protentiel dans le fonctionnement des organes reproducteurs. Elles pourraient stimuler la prolifération de capillaires fenêtrés dans les testicules, permettant ainsi la sortie de la testostérone et l'entrée de facteurs régulateurs extratesticulaires (Samson et al. 2004). Chez la femme, PROK2 est indétectable dans les ovaires, retrouvé dans l'endomètre mais avec une expression constante en comparaison de PROK1 qui s'exprime cycliquement durant les cycles menstruels dans l'ovaire et dans l'utérus, avec un pic lors de la fenêtre d'implantation et un rôle probable au cours de l'étape clé de d'implantation embryonnaire (Battersby et al. 2004; Ferrara et al. 2003). En 2002, l'équipe de Zhou identifiait PROK2 comme une protéine potentiellement impliquée dans la transmission du rythme circadien du noyau supra-chiasmatique (NSC) vers la périphérie (Cheng et al. 2002). Le système circadien endogène repose sur un mécanisme moléculaire complexe, une boucle moléculaire principale située dans NSC comprenant les facteurs de transcription Clock et Bmal1, les protéines Per (1-3) et Cry (1-2). Les facteurs de transcriptions Clock et Bmal1 s'hétérodimérisent et activent la transcription des gènes *Period (1-3)* et *Cryptochrome (1-2)*, à leur tour, les protéines Per (1-3) et Cry (1-2) s'hétérodomérisent et inhibent la transcription du dimère Clock et Bmal1. Les facteurs de transcription Clock et Bmal1 contrôlent également l'expression de gènes appelés "gènes contrôlés par l'horloge" (CCG, clock controlled genes) en se liant à leurs promoteurs au niveau d'une E-box. Le promoteur de *PROK2* contient des E-box, *PROK2* est un gène contrôlé par l'horloge. Un de ses rôles est de transmettre les messages rythmiques du NSC vers la périphérie. Sa transcription au niveau du NSC est régulée au cours du cycle, stimulée par la lumière, l'activation de sa transcription dans le NSC au cours de la phase lumineuse est 50 fois plus élevée qu'au cours de la phase nocturne (active) (Cheng et al. 2002) chez les souris (Figure 15A).

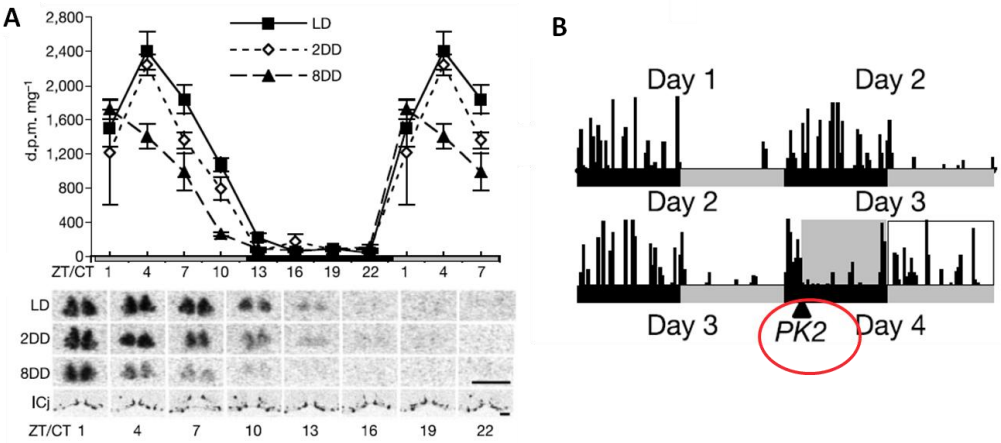


Figure 15: Implication de PROK2 dans les rythmes circadiens murins.
A : Régulation de la transcription de Prok2 au cours d'un cycle de 24h. ZT : Zeitgebers, LD : alternance de phase lumineuse et nocturne, 2DD : 2 jours continus de phase nocturne, 8DD : 8 jours continus de phase nocturne. B : Effets de l'injection intraventriculaire de Prok2 sur l'activité murine. L'activité locomotrice est représentée par les barres noires verticales. D'après (Cheng et al. 2002).

L'un de ses récepteurs, PROKR2, est exprimé au niveau des cibles primaires du NSC. L'administration de PROK2 en intraventriculaire chez le rat modifie le rythme circadien en les rendant calme et endormis la nuit et significativement plus actifs le jour et diminue leur température corporelle (Cheng et al. 2002) (Figure 15B). D'autre part, les souris *Prok2*$^{-/-}$ et *Prokr2*$^{-/-}$ ont des troubles du rythme circadien. De façon spécifique, la souris *Prok2*$^{-/-}$ dort moins longtemps au cours de la phase diurne de façon associée à une altération du cycle de sa température (Figure 16A) et du cycle de la corticostérone (Li et al. 2006). La souris *Prokr2*$^{-/-}$ perd la précision du début de son activité motrice nocturne avec une redistribution temporelle prononcée de son activité d'une période nocturne précoce vers une période nocturne tardive (Figure 16B) et elle a, elle aussi, une altération du cycle de la température (Prosser et al. 2007).

.

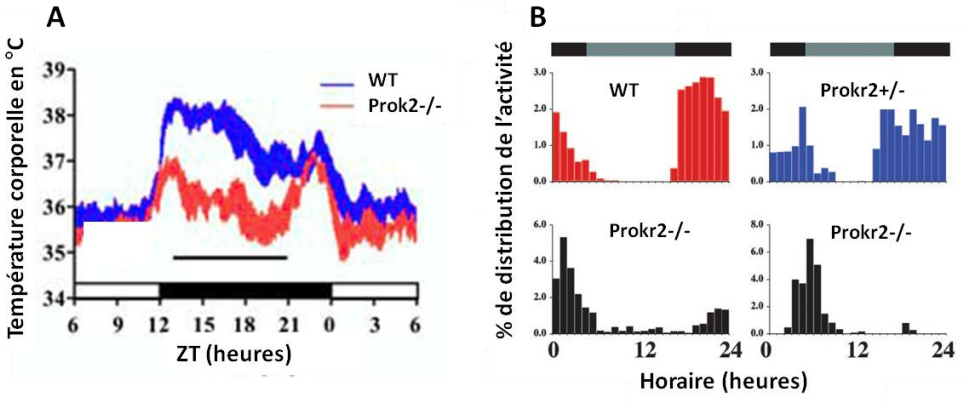


Figure 16: Altération du cycle circadien des souris *Prok2-/-* et *Prokr2-/-*

A : Altération du rythme circadien de la température corporelle chez la souris *Prok2-/-* . B : Altération de la distribution de l'activité chez la souris *Prokr2-/-* ZT : zeitgebers ou donneurs de temps en allemand. D'après (Li et al. 2006; Prosser et al. 2007).

Ainsi si PROK2 transmet le rythme circadien du NSC, il pourrait moduler d'autres comportements circadiens comme la prise alimentaire. L'expression hypothalamique de Prok2 est diminuée par le jeun (Gardiner et al. 2009) (Figure 17A). Le comportement alimentaire de rat après injection intra-ventriculaire cérébrale de Prok2 a été étudié (Figure 17B). L'injection intra-ventriculaire de Prok2 provoque une diminution de la prise alimentaire diurne, nocturne, de la prise alimentaire induite par le jeun ainsi que par celle induite par le neuropeptide Y, peptide orexigène (Negri et al. 2004) alors que l'injection intra ventriculaire d'un anticorps anti Prok2 augmente la prise alimentaire (Gardiner et al. 2009). Prok2 serait donc un peptide anorexigène.

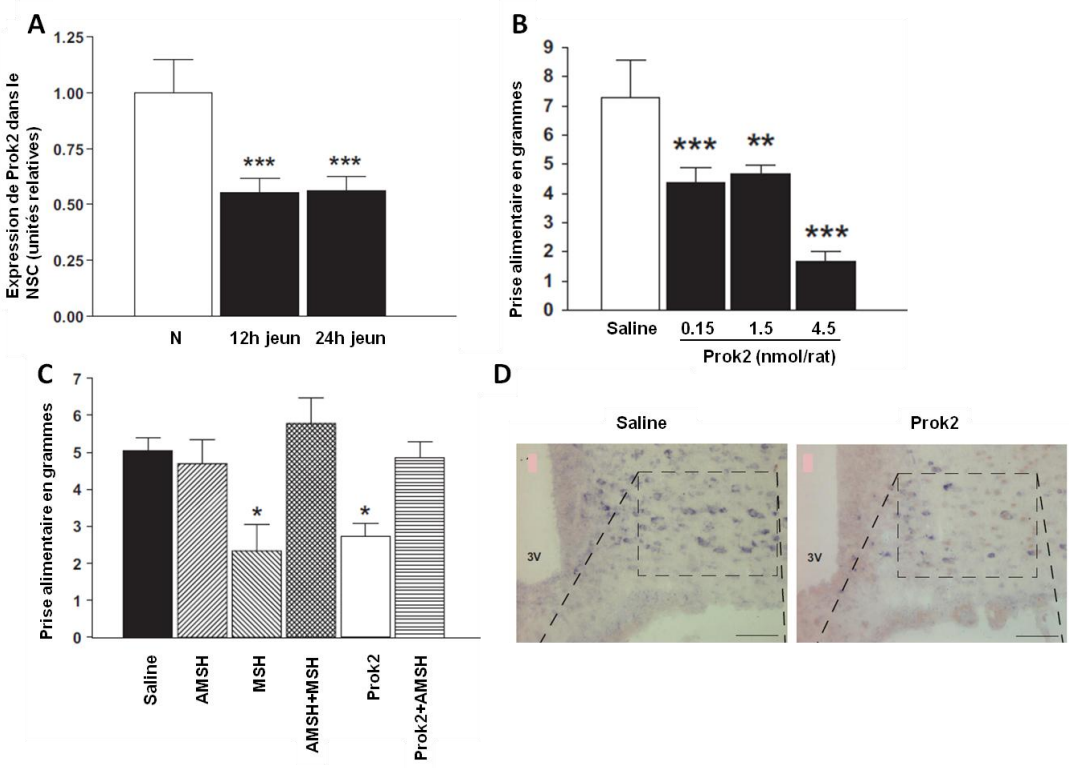


Figure 17: Prok2 et prise alimentaire chez le rat.
A : Expression de Prok2 au cours du jeun. B : Effet de l'injection intra-ventriculaire de Prok2 sur la prise alimentaire. C : Effets de l'injection intra-ventriculaire de l'antagoniste du récepteur de l'α-MSH, de l'α-MSH, de Prok2, de Prok2 associé à l'antagoniste du récepteur de l'α-MSH. AMSH : Antagoniste du récepteur de l'α-MSH, MSH : α-MSH. D : Expression de la POMC au niveau du noyau arqué après injection intra-ventriculaire de Prok2. D'après (Gardiner et al. 2009).

En intra-hypothalamique, seule l'injection de Prok2 dans le noyau arqué diminue la prise alimentaire. L'effet anorexigène de l'injection de Prok2 est secondaire à l'activation des récepteurs de Prok2 dans le noyau arqué. Des lésions du noyau arqué avaient déjà identifiées ce noyau comme un élément majeur de la régulation du comportement alimentaire (Kalra et al. 1999). Ainsi dans le modèle murin, Prok2 très exprimée le jour transmettrait le signal lumière au noyau arqué pour inhiber l'alimentation et la nuit, l'expression de Prok2 est minime. Le mécanisme de l'inhibition de la prise alimentaire par Prok2 pourrait passer par l'augmentation de la proopiomélanocortine (POMC) dans le noyau arqué (Figure 17D). En effet, l'augmentation de la POMC est suivie d'une augmentation de la sécrétion d'α-melanocyte-stimulating-hormone (α-MSH) et la co-administration d'un antagoniste d'α-MSH bloque les effets anorexigènes de Prok2 (Figure 17C) (Gardiner et al. 2009).

A l'heure actuelle, des mutations de l'un des 3 gènes KS suivants ne sont que rarement identifiées (environ 1 à 2% des patients mais évaluation en cours)

III.2.4 *CHD7*

Des mutations de *CHD7* ont été identifiées en 2004 chez des patients CHARGE après l'identification d'une délétion chevauchante du chromosome 8 chez 2 patients (Vissers et al. 2004). Actuellement, des mutations de *CHD7* sont responsables d'environ 60 à 70 % des cas de syndrome CHARGE (Jongmans et al. 2006; Zentner et al. 2010), 90% des syndromes CHARGE typiques (Bergman et al. 2011b). La plupart des mutations *CHD7* des patients CHARGE sont des mutations tronquantes, des mutations faux sens sont observées chez une minorité de patients, les délétions sont des évènements rares (revue, (Bergman et al. 2011b). La transmission est autosomique dominante avec une expressivité variable mais la plupart des cas sont des néomutations. Il n'y a pas de corrélation génotype/phénotype bien que les mutations faux sens semblent associées à des phénotypes plus légers (Jongmans et al. 2006). CHD7 est une protéine à chromodomaine liant l'ADN dont la fonction n'est pas connue. Elle interagit avec SOX2 pour réguler l'expression de nombreux gènes dont des gènes des voies Sonic Hedgehog (*Gli2, Gli3* et *Mycn*) et Notch (*Jag1*) (Engelen et al. 2011; Puc and Rosenfeld 2011). Chd7 est exprimé dans l'EO et dans le BO au cours de l'embryogénèse murine (Figure 18 et Tableau 3). Les souris hétérozygotes pour une délétion Chd7 ont une hypoplasie des BO et une diminution de neurones synthétisant la GnRH1 dans l'hypothalamus (Figure 19 et 20) (Layman et al. 2011; Layman et al. 2009). Les signes KS sont donc inclus dans le syndrome CHARGE. Kim et al ont émis l'hypothèse que le KS soit une forme mineure de CHARGE. Un séquençage systématique de *CHD7* chez des patients KS et HH normosmique leur ont permis d'identifier des mutations *CHD7* dans 4% des cas de KS (Kim et al. 2008) soit chez 3 patients (2 mutations faux sens et une mutation intronique responsable d'un saut d'exon). Le phénotype de ces patients dits KS mutés étaient peu décrits ne permettant pas de conclure formellement entre KS isolé ou CHARGE mineure incomplètement phénotypé. De plus, aucun test fonctionnel n'existe pour CHD7. Une seconde étude a montré que des mutations *CHD7* ne sont trouvées que chez des patients KS avec des anomalies phénotypiques de syndrome CHARGE (2 mutations non sens et 1 faux sens) (Jongmans et al. 2009). Une troisième étude a montré que 3/36 patients KS possèdent des mutations *CHD7* (Bergman et al. 2012) avec cependant également des signes cliniques de syndrome CHARGE associés. Chez ces 9 patients initialement diagnostiqués KS porteurs de mutations *CHD7* décrits dans la littérature, 4 muations non sens, 4 faux sens et 1 mutation intronique associée à un saut d'exon ont été identifiées. Parmi les signes cliniques associés, la surdité est le signe le plus fréquemment identifié (7/9) puis une fente labiale ou palatine (5/9). Un colobome uni ou bilatéral et une anomalie de l'oreille externe ne sont présents que chez 2 d'entre eux. Identifier une mutation *CHD7* a d'importantes implications cliniques, le dépistage des autres anomalies potentiellement associées car certaines d'entre elles peuvent ne pas être symptomatiques

mais avoir des conséquences thérapeutiques et, la réalisation d'un conseil génétique. En effet, il y a 50% de risque de transmission de la mutation à la descendance. Trois des mutations identifiées chez les patients dits HH ont été précédemment décrites chez des patients ayant un syndrome CHARGE sévère (IVS+5G>C, S834F et R2024X) (Delahaye et al. 2007; Jongmans et al. 2008; Jongmans et al. 2009; Kim et al. 2008; Vissers et al. 2004), il n'y a donc pas de corrélation phénotype génotype et la descendance des patients KS risque de développer une forme plus sévère. On doit discuter diagnostic prénatal et préimplantatoire.

CHD7 est un gène de 37 exons, la recherche de mutations de *CHD7* chez les patients KS est actuellement réservée aux patients ayant un KS et 2 signes parmi ceux-là , colobome, atrésie choanale, anomalies oreilles externes, dysfonction d'un nerf crânien, trouble de l'équilibre ou si il existe une anomalies des canaux semi circulaires (Bergman et al. 2011b).

III.2.5 *WDR11* et *HS6ST1*

WDR11 a été identifié comme un gène KS à partir d'un patient KS porteur d'une translocation chromosomique équilibrée, 46,XY,t(10 ;12)(q26.12 ;q13.11)(Kim et al. 2010). Cinq mutations de *WDR11* ont ensuite été identifiées chez 6 patients, 5 HH normosmiques et 1 KS dans une cohorte de 201 patients mélangeant KS et HH normosmiques. Aucun de ces 6 cas n'avait d'analyse familiale (Kim et al. 2010). Les mutations ont toujours été identifiées à l'état hétérozygote. Wdr11 est fortement exprimé dans le système olfactif en développement, dans le BO, l'EO et le mésenchyme (Figure 18 et Tableau 3), il n'existe pas, à l'heure actuelle de modèle murin invalidé pour *Wdr11*. Anciennement appelée BRWD2, il s'agit d'une protéine qui contient 12 WD domaines (répétition de tryptophane et d'acide aspartique). Elle a été initialement identifiée comme potentiel suppresseur de tumeur et interagit *in vitro* avec EMX1. EMX1 est un facteur de transcription qui semble impliqué dans le développement télencéphalique (Yoshida et al. 1997). Cette interaction pourrait être en lien avec le KS car 3 des mutations identifiées affectent cette la liaison. Plus récemment, il est apparu que la seule mutation identifiée de *WDR11* chez un patient KS était associée à une mutation C164R de *KAL1* (Quaynor et al. 2011). La responsabilité des mutations de *WDR11* dans le KS reste à démontrer.

Les HS interagissent avec l'anosmine-1, FGFR1 et PROKR2. Les études transgéniques (de sous et sur expression *kal1*) de *c.elegans* avait mis en évidence la nécessité d'une modification 6-O sulfate spécifique des HS (par hst-6) pour permettre à l'anosmine-1 d'agir *in vivo* (Bulow et al. 2002; Bulow and Hobert 2004). Une approche gène candidat a mis récemment en évidence des mutations de *HS6ST1*, l'homologue humain de hst-6 chez 5 patients KS avec un rôle délétère démontré *in vitro* : une diminution de l'activité sulfotransférase et l'absence de sauvetage de la perte du phénotype kal-1 due à des

mutations hst-6 (Tornberg et al. 2011). Chez la souris, Hs6st1 est très exprimé dans le système nerveux au cours du développement, en particulier dans le télencéphale et les structures sensoriels (Figure 18) (Sedita et al. 2004) mais aucune anomalie morphologique des BO n'a été observée chez les souris invalidées (Izvolsky et al. 2008).

Expression au cours de l'embryogénèse	Kal1	Fgfr1	Fgf8	Prokr2	Prok2	Chd7	Wdr11	H6st1
BO	+++	+++	-	-	+	+	++	+
EO	-	+	++	+	+	+	++	+++
Mésenchyme nasal	-	+++	-	+	-	-	++	+
Neurones synthétisant GnRH1	-	+	-	-	/	/	/	/

Tableau 3: Récapitulatif des expressions des gènes KS dans le système olfactif au cours de l'embryogénèse humaine pour Kal1 et murine pour les autres gènes KS.
/ signifie que cela n'a pas été recherché.

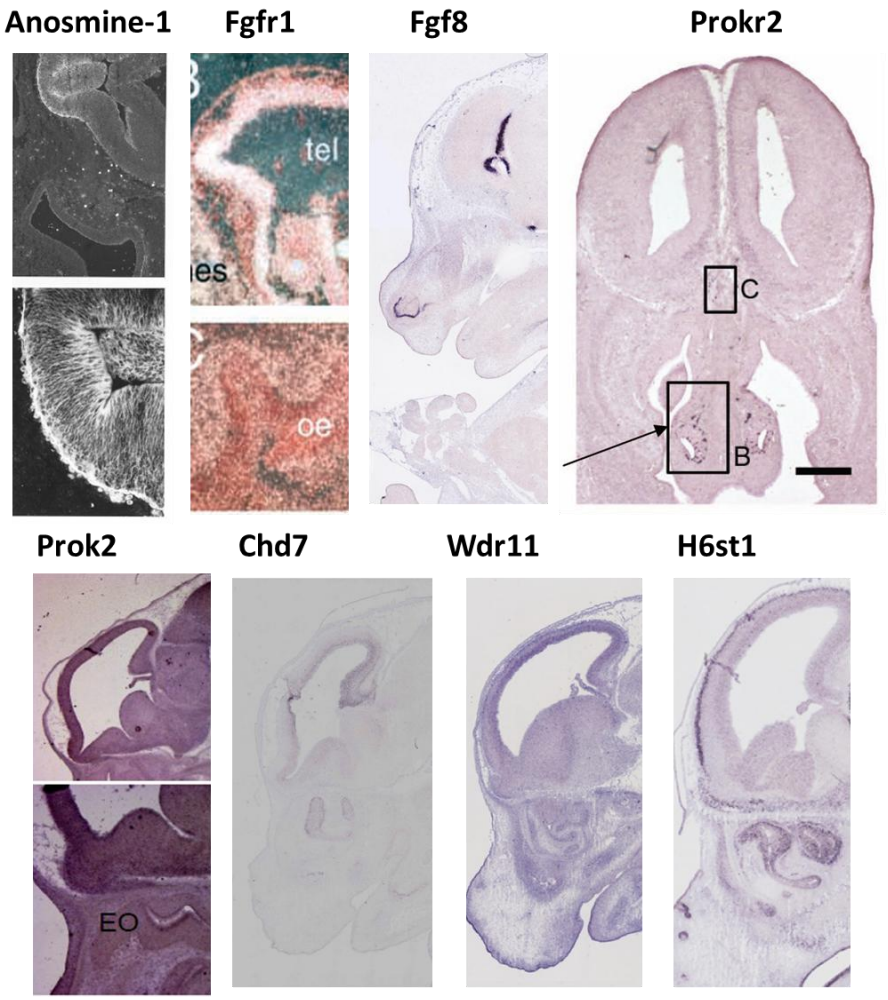


Figure 18: Expression des gènes KS au cours de l'embryogénèse humaine pour KAL1 et murine pour les autres gènes KS.
D'après (Cole et al. 2008; Hardelin et al. 1999; Hebert et al. 2003) et la base de données MGI.

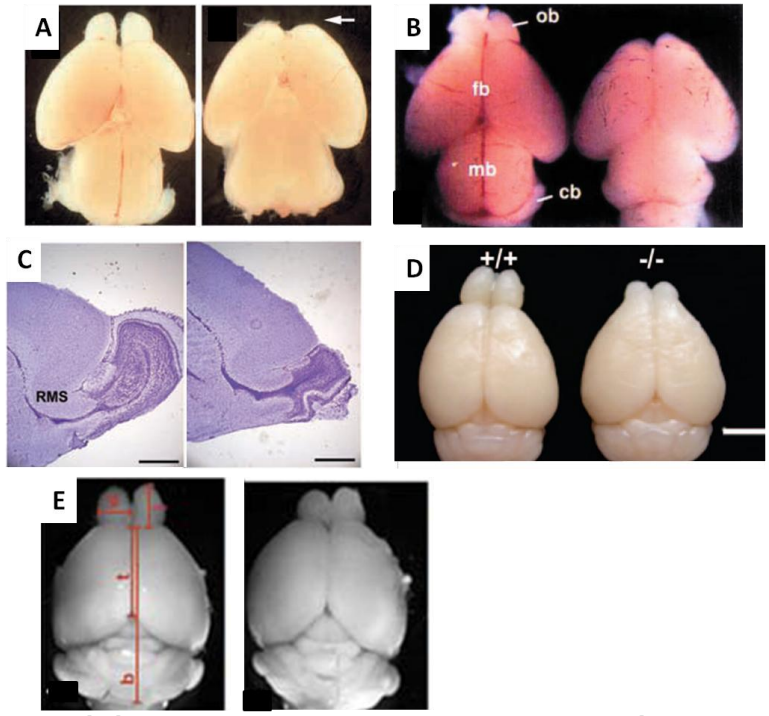


Figure 19: Morphogénèse des bulbes olfactifs chez les modèles murins.
A : Contrôle et *Fgfr1* invalidé dans le télencéphale à E.16.5, B : Contrôle et mutant *Fgf8* hypomorphe à E18.5, C : Contrôle et mutant *Prok2*$^{-/-}$ à l'âge adulte, D : Contrôle et mutant *Prokr2*$^{-/-}$ à l'âge adulte. E : Contrôle et mutant *Chd7*$^{+/-}$ à l'âge adulte.

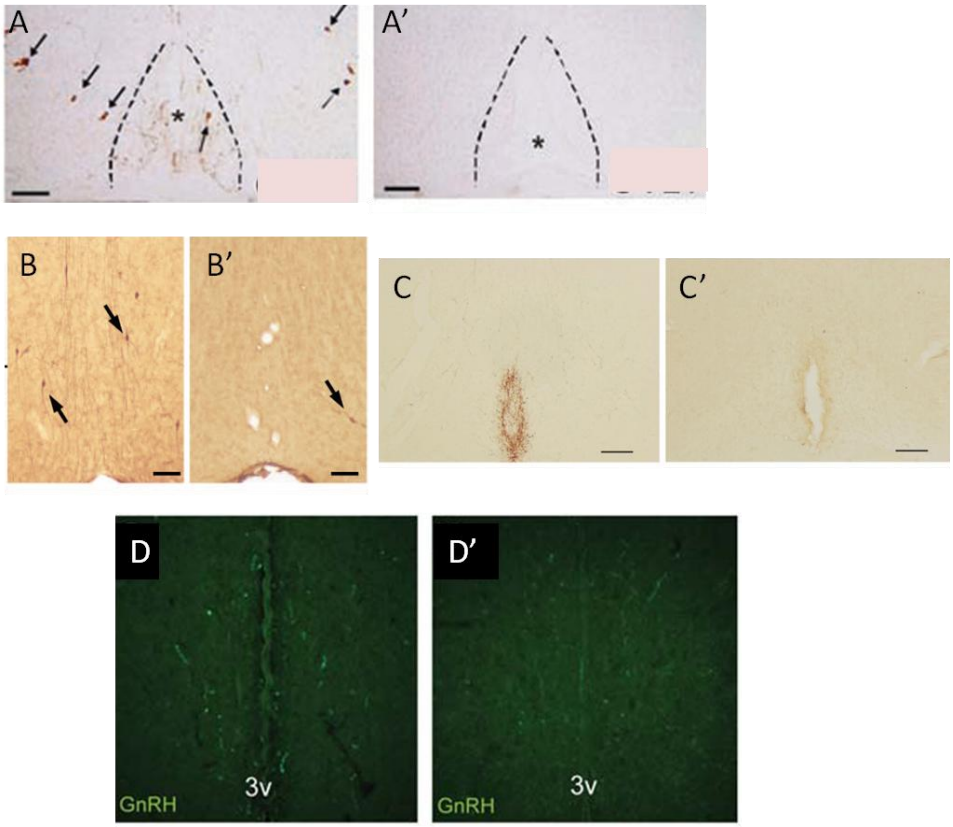


Figure 20: Expression des neurones synthétisant la GnRH1 dans l'aire préoptique des modèles murins.
A : contrôle, A' : souris *Fgf8* hypomorphe ; B : contrôle, B' : souris *Prok2*$^{-/-}$; C : contrôle, C' : souris *Prokr2*$^{-/-}$; D : contrôle, D' : souris *Chd7*$^{+/-}$.

III.3 Gènes KS : Mode de transmission

Les mutations de *KAL1* et de *FGFR1* sont responsables respectivement des formes de KS liées à l'X et de formes autosomiques dominantes. Il a été démontré que les mutations *PROK2* et *PROKR2* étaient transmises de façon autosomiques récessives (Leroy et al. 2008) seulement dans de très rares cas. La majorité des patients mutés *PROKR2* possède des variations de séquence monoallélique. Nous avons remarqué que des malades ayant une mutation *PROKR2* bi allélique (Famille 1, Figure 14A) pouvaient avoir le même phénotype que d'autres patients n'ayant que cette même variation monoallélique (Famille 2, Figure14B).

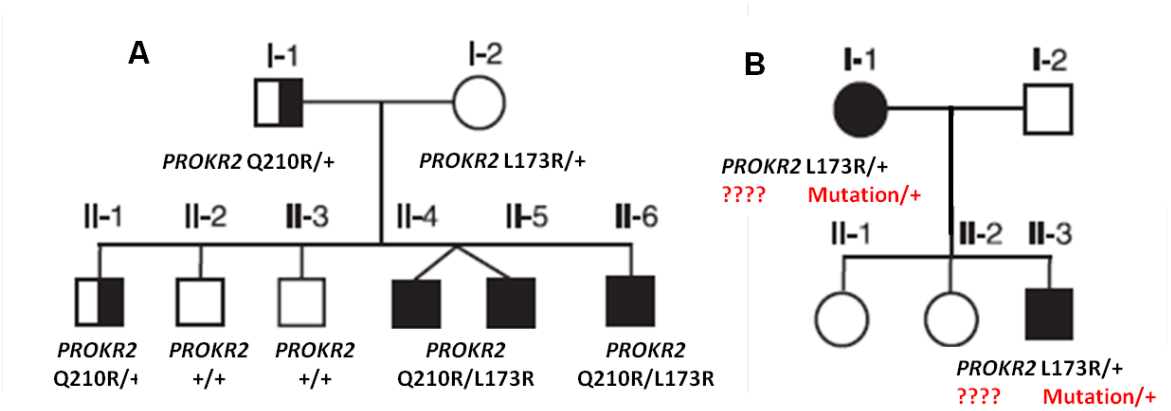


Figure 14: Mode de transmission des mutations *PROKR2* chez des patients KS.
Les symboles pleins ont un KS, la moitié droite remplie uniquement une anosmie. A : Transmission autosomique récessive des mutations *PROKR2*. B : Transmission pseudo dominante de la mutation L173R de *PROKR2*. D'après (Dode et al. 2006).

Il apparaît clairement que le mode de transmission autosomique récessif ne peut s'appliquer à la famille 2 de transmission pseudo-dominante. Il est possible qu'un autre gène muté situé sur un autre chromosome que *PROKR2* soit présent chez la mère et le fils. A l'appui d'autres observations nous avons donc fait l'hypothèse d'une possible transmission digénique, à savoir : - Seules les souris homozygotes invalidées pour Prokr2 ont un phénotype KS, les souris hétérozygotes ont un phénotype normal, confirmant la transmission autosomique récessive à partir d'animaux possédant des fonds génétiques identiques. - Plusieurs des mutations *PROKR2* sont observées dans la population humaine contrôle. Dans l'hypothèse d'un modèle digénique une mutation *PROKR2* monoallélique ne suffit pas au phénotype KS il n'est donc pas surprenant que ces mutations bien qu'ayant un effet délétère prouvé soient présentes dans la population témoin.

La participation d'un digénisme dans le mode de transmission des mutations *PROK2* ou *PROKR2* chez les patients KS a été confirmée par l'identification d'un patient KS associant une mutation *PROKR2* L173R et une mutation *KAL1* S396L (Dode et al. 2006).
Les mutations de *FGF8* et de *HS6ST1* ont également été identifiées à l'état hétérozygote et homozygote (1 variation à l'état homozygote chez un patient pour ces 2 gènes). L'association d'une transmission autosomique récessive à un probable oligogenisme est l'hypothèse retenue. Il n'existe pas d'arbre généalogique et de ségrégation familiale des mutations *CHD7* et *WDR11* ce qui ne permet pas d'établir des hypothèses de transmission de ces formes génétiques.

.

III.4 Corrélation génotype/phénotype

III.4.1 HH et déficit olfactif

La variabilité phénotypique des signes cardinaux de KS dépend de la forme génétique de la maladie. En effet, la variabilité de l'HH est moindre dans les formes liées à des mutations *KAL1* en comparaison des formes liées à des mutations de *FGFR1* avec un HH cliniquement et biologiquement plus profond dans les formes liées à des mutations *KAL1* (Salenave et al. 2008). De façon associée, le déficit olfactif semble moins variable dans le groupe de patients mutés *KAL1* où les 21 patients mutés sont anosmiques alors que 2 patients sont hyposmiques et 2 patients sont normosmiques dans le groupe des 18 patients mutés *FGFR1* (Salenave et al. 2008). Cependant, l'absence de déficit olfactif a été observé chez 2 sur 15 patients mutés *KAL1* dans une autre série mais avec une hypoplasie bilatérale des BO à l'IRM (Sato et al. 2004) et un degré variable d'atteinte olfactive a été rapportée chez 3 frères porteurs d'une délétion *KAL1* (exon3-exon13) allant d'une hyposmie modérée à une anosmie à l'olfactométrie (Massin et al. 2003). Concernant ces signes cardinaux, les autres formes génétiques de KS liées aux mutations de *PROK2, PROKR2, FGF8* semblent proches phénotypiquement des formes liées à des mutations *FGFR1* avec une grande variabilité des atteintes gonadotropes et olfactives (Dode et al. 2006; Falardeau et al. 2008; Sarfati et al. 2009; Trarbach et al. 2010) (Figures 21 et 22). Le degré d'hypogonadisme et de déficit olfactif peut varier au sein d'une famille atteinte (Dode et al. 2003; Pitteloud et al. 2006a; Pitteloud et al. 2005; Pitteloud et al. 2006b) avec dans une même famille, un patient KS, sa mère ayant un simple retard pubertaire sans déficit de l'olfaction (arbre généalogique, Figure 21 gauche) ou une absence de symptôme (arbre généalogique, Figure 21 droite) et un grand-père maternel n'ayant qu'une anosmie isolée (Dode et al. 2003; Pitteloud et al. 2005; Pitteloud et al. 2006b).

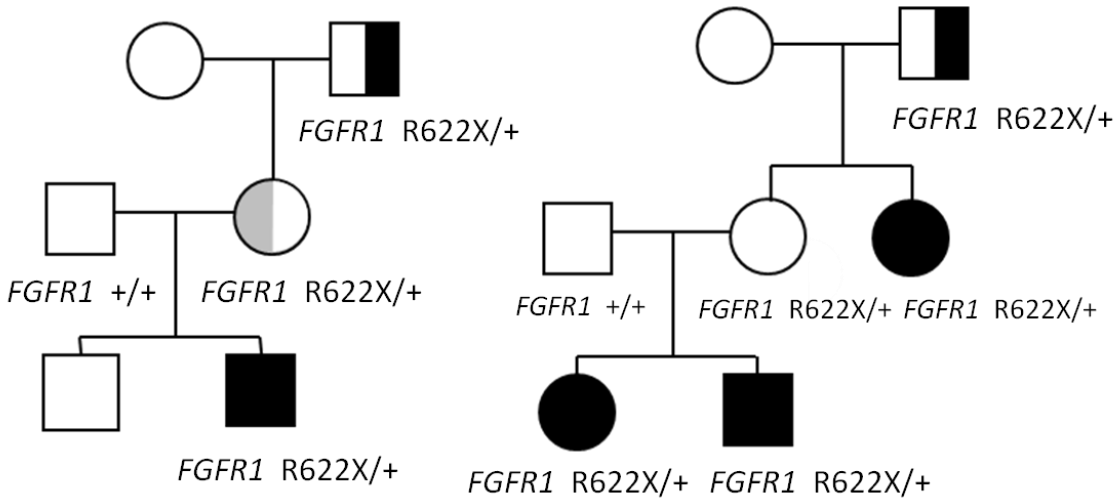


Figure 21: Exemples de variabilité phénotypique de 2 familles KS porteuses d'une mutation R622X de *FGFR1*.
Les symboles pleins sont des patients KS, la moitié droite des symboles reflète l'olfaction (gris: hyposmie, noir: anosmie), la moitié gauche l'atteinte gonadotrope (gris: retard pubertaire, noir: HH). D'après (Dode et al. 2003; Pitteloud et al. 2005).

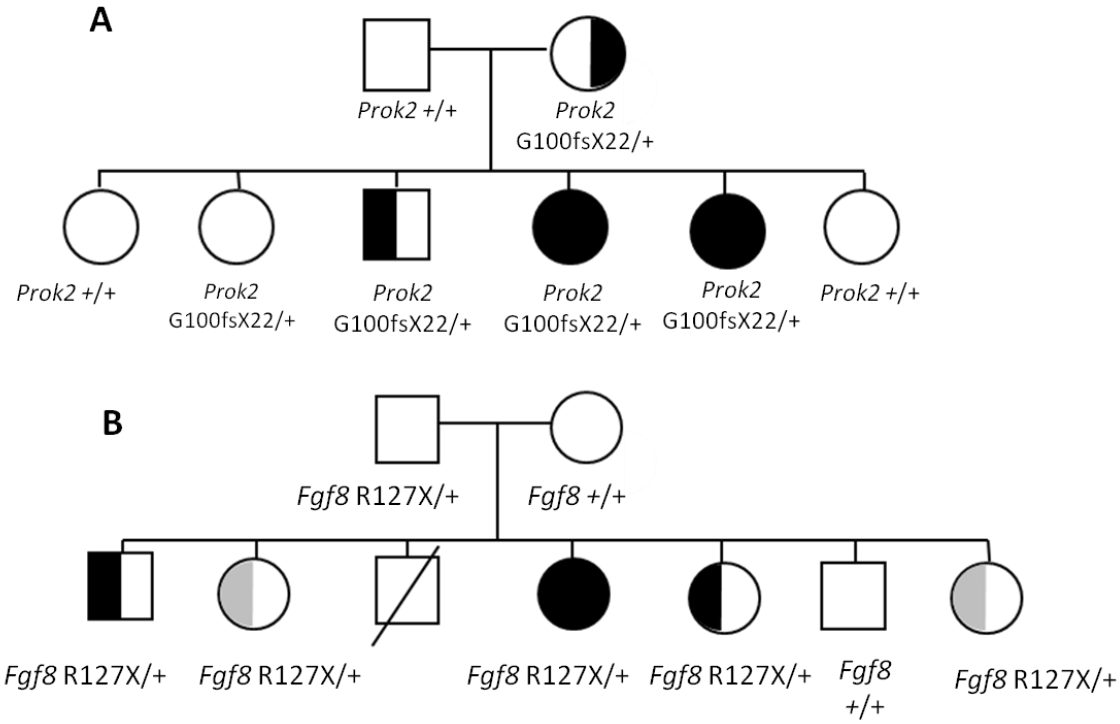


Figure 22: Variabilité des atteintes gonadotropes et olfactives dans 2 formes génétiques de KS liées à des mutations *PROK2* et *FGF8*.
A : Famille avec mutation G100fsX22/+ de *PROK2*, B : Famille avec mutation R127X/+ de *FGF8*. Les symboles pleins sont des patients KS, la moitié droite des symboles reflète l'olfaction (gris: hyposmie, noir: anosmie), la moitié gauche l'atteinte gonadotrope (gris: retard pubertaire, noir: HH). D'après (Dode et al. 2006; Sarfati et al. 2009; Trarbach et al. 2010).

A ce jour, les mutations *CHD7* et *WDR11* ont été identifiées chez des patients KS avec anosmie et HH mais ces mutations étaient soit *de novo* soit la ségrégation familiale n'était pas étudiée (Kim et al. 2010; Kim et al. 2008). Dès les premiers patients décrits avec mutations de *HS6ST1* il a été observé une grande variabilité de l'HH ; HH, puberté retardée ou phénotype normal chez des patients *HS6ST1*: R313Q/+ et une variabilité de l'atteinte olfactive clinique (hyposmie et anosmie) (Tornberg et al. 2011).

Un degré de complexité supplémentaire de la corrélation génotype/phénotype est la discordance phénotypique observée entre des jumeaux monozygotes : l'un d'entre eux avait un KS, l'autre une hyposmie isolée (Hipkin et al. 1990) ou l'une avec un KS, l'autre une anosmie isolée (Hermanussen and Sippell 1985). Historiquement ces discordances entre jumeaux considérés comme génétiquement identiques, suggéraient l'intervention de facteurs environnementaux. De façon récente, des différences épigénétiques ont été mises en évidence entre jumeaux monozygotes (Fraga et al. 2005; Kaminsky et al. 2009) ainsi que des variations génomiques du nombre de copies (Bruder et al. 2008; Maiti et al. 2011). Ces différences génétiques s'ajoutent ainsi aux facteurs environnementaux pour expliquer ces discordances.

III.4.2 Signes associés

Enfin, comme nous l'avons vu au paragraphe Introduction II.2, le KS peut s'accompagner d'autres symptômes, certains sont spécifiques d'une forme génétique de la maladie, d'autres communs, ils sont résumés dans le Tableau 4.

Forme génétique	***KAL1***	***FGFR1 et FGF8***	***PROK2 et PROKR2***	***CHD7 (n=9)***	***WDR11 (n=1)***	***HS6ST1 (n=5)***
Syncinésies controlatérales	Oui 75% des cas	Rares	Rares	1 cas	Non	Non
Agénésie rénale	Oui 30%	Non	Non	Non	Non décrit	Non décrit
Fente labiale et/ou palatine	Non	Oui, 25 à 30%	Non	Oui 7/9	Non	Oui
Agénésie dentaire	Oui , rare	Oui	Oui	Oui	Non	Non
Surdité	Oui	Oui, rares	Oui, rares	Oui 5/9	Non	Non
Autres	Pieds creux, ptosis, brachymétacarpie, agénésie vas déférent….	Phénotype squelettique Agénésie CC, RM, hypertélorisme…	Troubles du sommeil ?	Nystagmus, trouble de l'équilibre, bicuspidie aortique…	/	/

Tableau 4: Signes cliniques associés aux différentes formes génétiques de KS.
Les signes cliniques autres ne sont pas exhaustifs (…), le phénotype squelettique comprend l'absence de cartilage nasal, une agénésie ou une hypoplasie de l'oreille externe, une hypoplasie mandibulaire, une syndactylie, une clinodactylie…CC : corps calleux, RM : retard mental.

L'agénésie rénale est associée dans approximativement 30% des mutations *KAL1* (Hardelin et al. 1993; Kirk et al. 1994). Les syncinésies bimanuelles controlatérales, bien que décrites rarement dans d'autres formes génétiques de KS, sont de façon prédominante présentes dans les formes liées à des mutations *KAL1*. Ces signes associés à des mutations *KAL1* ont également une variabilité intrafamiliale. Ainsi chez les 3 frères porteurs d'une délétion large de *KAL1* (exon3 à 13), 2/3 ont une agénésie rénale, 2/3 des syncinésies controlatérales dont l'un des 2 n'avait pas d'agénésie rénale (Massin et al. 2003). Certains signes cliniques sont communs à différentes formes génétiques de KS tels que l'hypodontie et la présence d'une surdité dont la fréquence n'a pas été évaluée. Ces anomalies dentaires sont variables, le nombre de dents manquantes pouvant aller de une à neuf (Bailleul-Forestier et al. 2010). La présence de fentes palatines est rapportée dans 25 à 30% des cas des formes *FGFR1* (Albuisson et al. 2005; Dodé et al. 2007; Dodé et al. 2003; Pitteloud et al. 2006b; Trarbach et al. 2006a), elles sont également rapportées dans les formes liées à *FGF8*, *HS6ST1* et *CHD7*. Des anomalies palatines plus communes comme un palais ogival ont aussi été notées chez des patients mutés *KAL1*, *PROK2* ou *PROKR2*.

Ainsi, dans le KS, il existe une grande variabilité phénotypique des signes cardinaux et des signes associés au sein des différentes formes génétiques et en intrafamiliale (avec la même mutation identifiée) de gène KS suggérant l'intervention d'autres facteurs : mutations de gènes non identifiés (digenisme/oligogénisme), autres anomalies génétiques ou facteurs environnementaux…

III.5 Autres pathologies associées à des mutations de gènes KS

III.5.1 HH normosmique isolé

L'HH normosmique isolé est une maladie distincte de KS mais des mutations de gènes KS ont été identifiées chez des patients normosmiques. Le diagnostic différentiel est difficile à établir du fait du degré variable du déficit olfactif des KS et de l'absence fréquente de test objectif de l'olfaction réalisé. Des mutations *FGFR1* ont été identifiées chez des patients HH normosmiques. Leur odorat a été testé objectivement et une IRM des BO a objectivé l'absence d'anomalies des structures olfactives (Pitteloud et al. 2006a; Raivio et al. 2009; Trarbach et al. 2006b). Les cas familiaux peuvent appartenir à des familles mixtes, KS et HH normosmique, à des familles où coexistent des anomalies de la ligne médiane ou à des familles d'HH normosmiques isolés. De la même façon, des mutations de *PROK2, PROKR2* et *FGF8* ont été identifiées chez des patients HH normosmiques (Cole et al. 2008; Falardeau et al. 2008; Pitteloud et al. 2007b; Sarfati et al. 2009; Trarbach et al. 2010). Chez certains d'entre eux, une IRM des BO venait confirmer l'absence d'anomalie des structures olfactives (Cole et al. 2008) mais le plus souvent le déficit olfactif n'est évalué que cliniquement. Des

mutations *CHD7, WDR11* et *HS6ST1* ont été identifiées chez des patients HH normosmiques aucun d'entre eux n'a d'IRM des structures olfactives. A l'inverse, aucune mutation *KAL1* n'a été associée à l'absence d'anomalie olfactive (clinique ou IRM). Ainsi, des mutations *FGFR1, FGF8* et *PROKR2* ont été identifiées chez des patients HH normosmiques démontrant un chevauchement génétique entre ces 2 maladies.

III.5.2 Aménorrhée hypothalamique fonctionnelle (AHF)

L'AHF est une forme transitoire, majoritairement réversible de déficit en GnRH dont la physiopathologie est débattue. Classée comme psychogène, elle est le plus souvent en rapport avec un apport calorique insuffisant, de l'exercice physique excessif ou une détresse psychologique. Chez les femmes, la sensibilité de la sécrétion de GnRH à ces différents stress est variable pouvant être en lien avec la présence de mutations de gènes impliqués dans les déficits en GnRH. En effet, parmi 55 femmes AHF, des mutations de gènes HH étaient identifiées chez 7 d'entre elles à l'état hétérozygote : 2 mutations *FGFR1* (G260E et R756H), 2 mutations *PROKR2* (R85H et L173R chez 3 patientes), 1 mutation *KAL1* V371I (Caronia et al. 2011). Ces mutations pourraient contribuer à la susceptibilité variable de certaines femmes aux modifications fonctionnelles de la sécrétion de GnRH. Cependant, le phénotype olfactif de ces patientes n'est pas précisé (clinique et/ou IRM) et on ne peut éliminer qu'il s'agisse de forme mineure de KS.

III.5.3 Fente labiale non syndromique

Une fente labio-palatine isolée ou non syndromique est une anomalie congénitale touchant environ 1 naissance sur 700. Des facteurs environnementaux et génétiques sont connus pour jouer un rôle dans le développement de ces fentes. Par une approche gène candidat, des mutations de différents membres de la famille des FGFs et des récepteurs aux FGFs ont été recherchées dans une cohorte de 184 patients ayant une fente labio-palatine (Riley et al. 2007). Deux mutations faux sens de *FGFR1* ont été identifiées à l'état hétérozygote, M369I et E467K. Ces 2 mutations se situent sur des acides aminés conservés au sein des espèces entre le 3ème domaine immunoglobuline like et le domaine transmembranaire et entre le domaine transmembranaire et le domaine tyrosine kinase. Chacune d'entre elles était présente dans 2 familles non liées. La mutation M369I ségrégeait avec la maladie même si des membres non atteints étaient porteurs de la mutation. En revanche, un des membres atteints n'était pas porteur de la mutation E467K. Une mutation faux sens de *FGF8* D73H était identifiée chez un patient *de novo*. Les analyses structurales prévoient qu'elle est responsable d'une diminution de l'affinité aux récepteurs.

III.5.4 Holoprosencéphalie (HPE)

L'HPE est une malformation cérébrale complexe résultant d'une division incomplète du prosencéphale survenant entre le 18ème et le 28ème jour de vie embryonnaire et affectant à la fois le cerveau et la face. Sa prévalence est de 1/16000 naissances vivantes et 1/250 embryons. Par une approche gène candidat, des mutations de *FGF8* ont été recherchées chez 360 patients ayant une HPE plus ou moins sévère (Arauz et al. 2010) et chez 47 patients ayant une HPE (McCabe et al. 2011). Dans la première série, une mutation hétérozygote T229M était identifiée au sein d'une famille avec des conséquences cliniques variables, son caractère délétère a été démontrée *in vitro* (Falardeau et al. 2008). Cette mutation avait déjà été identifiée à l'état hétérozygote chez un patient ayant un HH acquis isolé sporadique (Falardeau et al. 2008). Dans la 2ème série, une mutation R189H homozygote a été identifiée. La faible incidence de ces mutations dans la cohorte d'HPE suggère que *FGF8* n'est pas un facteur génétique majeur des HPE mais la présence d'une mutation à l'état homozygote permet d'associer l'HPE aux mutations *FGF8*.

III.5.5 Dysplasie septo-optique (DSO) et déficit hypophysaire combiné multiple associé ou non à une interruption de la tige hypophysaire.

La DSO est l'association de déficits hormonaux hypophysaires, d'hypoplasie du nerf optique et de défauts de la ligne médiane dont une agénésie du septum pellucidum (membrane séparant les 2 ventricules latéraux) et/ou du corps calleux. Par une approche gènes candidats, des mutations de *FGF8* ont été recherchées chez 374 patients DSO (McCabe et al. 2011), des gènes KS (*KAL1, FGFR1, FGF8, PROK2* et *PROKR2*) chez 103 patients ayant une DSO ou un déficit hypophysaire combiné multiple (Raivio et al. 2012) et de *PROK2* et *PROKR2* chez 72 patients ayant une interruption de la tige hypophysaire (Reynaud et al. 2012). Trois mutations faux sens de *FGFR1*, T112T, S450F et P483S, ont été identifiées chez des patients DSO. La mutation T112T pourrait modifier l'épissage selon des prédictions *in silico*, les mutations S450F et P483S diminuent *in vitro* le signal du récepteur. Une mutation Q216E et une mutation T72T de *FGF8* ont été identifiées chez des patients ayant soit une DSO soit un déficit hypophysaire combiné multiple. La mutation T72T est gain de fonction sur le signal FGFR1 *in vitro*. Quatre mutations faux sens pertes de fonction de *PROKR2*, R268C, R85G, R85H et L173R ont été mises en évidence chez 6 patients ayant soit une DSO soit un déficit hypophysaire combiné multiple associé ou non à une interruption de tige. Ces mutations ont été identifiées chez des patients KS mais également, pour trois d'entre elles, dans la population témoin. Il est ainsi difficile d'établir la participation au phénotype de ces mutations.

IV Objectifs de la thèse

Les objectifs de la thèse étaient doubles.

Il s'agissait d'améliorer la compréhension des formes génétiques de KS secondaire aux mutations *PROK2* et *PROKR2* et de tenter de répondre à différentes interrogations : Existe il des signes associés spécifiques de cette forme génétique ? Comme le modèle murin, y a-t-il des effets de l'insuffisance de signalisation PROKR2 sur le comportement alimentaire et sur les rythmes circadiens de nos patients mutés ? Confirme-t-on l'hypothèse du mode de transmission digénique voire oligogénique de ces mutations, proposée lors de l'identification de celles-ci ?

Enfin, 60 à 65% de nos patients KS n'ont pas de mutation dans les gènes KS connus actuellement. Il s'agissait d'identifier par une approche cytogénétique, grâce à un patient porteur d'une translocation complexe, un nouveau gène KS.

PATIENTS et METHODES

I Patients

I.1 Patients participant à l'étude rythme et sommeil

Les résultats de 2 questionnaires, Horne et Ostberg et Pittsburgh (Annexe I et II) ont été collectés chez 13 patients mutés *PROK2* ou *PROKR2* (2 mutations à l'état biallélique et 11 mutations monoalléliques) et chez 21 patients KS sans mutation *PROK2* ou *PROKR2.* D'autre part, les résultats du score de Horne et Ostberg avaient été collectés chez 34 témoins et ceux du score de Pittsburgh chez 10 sujets témoins par l'équipe du Dr Arnulf à La Pitié salpétrière.

I.2 Données cliniques du patient porteur de la translocation complexe initialement 46, XY, inv (3) (q24q26.32), t (3 ; 13 ; 18) (q26.32 ; q21.2 ; q12.2)

Il s'agit d'un sujet masculin présentant à la naissance des signes d'HH congénital (micropénis et cryptorchidie). associé à des anomalies mineures, une arète du nez large et un philtrum long. Le diagnostic de KS a été fait à l'adolescence devant l'association d'un HH, d'une anosmie et d'une absence bilatérale de bulbes olfactifs et des sillons olfactifs à l'IRM sans autre anomalie psycho-développementale. L'imagerie hypophysaire est normale. Les informations données sur sa structure familiale étaient limitées, la mère a un caryotype normal, le père est dit normal mais son caryotype n'est pas disponible, il n'a pas pu être réalisé.

I.3 Données cliniques des patients chez qui une mutation de l'alpha dystrobrévine a été recherchée

Ces patients appartiennent à la cohorte de patients KS dont l'ADN a été collecté par le Dr Dodé dans le service de biochimie et génétique moléculaire du Pr M. Delpech à l'hôpital Cochin. Ces patients n'avaient pas de mutation dans les gènes connus. Il s'agissait de cas familiaux et sporadiques.

II Méthodes

II.1 Questionnaires collectés pour l'étude rythme et sommeil

Nous avons demandé à nos patients KS mutés *PROK2* ou *PROKR2* comparativement à des malades un KS sans mutation de compléter 2 questionnaires permettant de calculer des scores, l'un sur les rythmes circadiens appelé score de Matinalité-Vespéralité de Horne et Ostberg (Horne and Ostberg 1976), le 2ème évaluant le sommeil, le score de sommeil de Pittsburgh (Buysse et al. 1989). Ces 2 questionnaires sont dans les annexes I et II. Le score de Horne et Ostberg évalue le chronotype du patient ce qui correspond à déterminer si le patient est « couche tôt ou couche tard ».

II.2 Préparation des ADNs génomiques

Les ADNs génomiques ont été obtenus à partir de prélèvements sanguins selon une procédure d'extraction classique. Un consentement écrit pour la recherche de gènes Kallmann connus et pour la recherche a été obtenu pour chacun des patients.

II.3 Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur chromosomes

II.3.1 Préparation des sondes

Les sondes sont marquées par un kit de Nick Translation (translation de coupure) Roche. Pour 5 ADNs à marquer (de 1µg chacun), le mélange comprend 5µl de dATP, dCTP et dGTP à 2.5mM chacun ainsi que 3.4µl de dTTP (2.5mM) et 4µl de Fluorescein isothiocyanate-12-dUTP (FITC-12-dUTP) à 1mM ou de Tetramethylrhodamine isothiocyanate-6-dUTP (TRITC-6-dUTP) à 1mM et 27.6µl d'H_2O. L'incubation est faite à 15°C pendant 10h puis à 70°C pendant 10 min, et refroidi à +4°C.
Le jour de l'hybridation, les sondes sont dénaturées 10 min à 74°C puis 1h à 37°C.

II.3.2 Préparation chromosomique

Après avoir repéré les mitoses au microscope les lames sont prétraitées de façon standardisée pour les fixer. Les lames sont plongées dans du 2X SSC à 72°C pendant 2 min puis dans du formaldhéhyde 15 min à température ambiante suivi d'un rinçage dans du PBS 1X 5 min à température ambiante. Un traitement par de la pepsine diluée en HCl 0.01N et à une concentration de 0.5µg/ml est effectuée pendant 13 min à 37°C. Les lames sont ensuite rincées 2 fois au PBS X 5 min à température ambiante puis déshydratées en éthanol 50%, 75%, 100% 5 min à chaque fois. Enfin, elles sont séchées à température ambiante. L'ADN

est dénaturé en simple brin en plongeant les lames 20 minutes maximum avant le dépôt des sondes en les plongeant dans un bain de formamide 70%/ 2SCC à 74°C puis dans des bacs d'éthanol froid à 50%, 75%, 100%, 2 min à chaque fois.

II.3.3 Hybridation

Les sondes dénaturées sont déposées sur les lames et incubées au four à 37°C.

II.3.4 Rinçages

Les lames sont rincées 2 min dans du 0.4 X SCC/0.3% Igepal à 74°C. La coloration des noyaux est faite par addition de 40µl de DAPI à 40µg/ml en Vectashield.

II.3.5 Analyse microscopique

La lecture des lames a été effectuée à l'aide d'un microscope Nikkon E1000, l'acquisition et le traitement des images s'est fait avec le logiciel Genikon.

II.4 Puces à ADN ou CGH (Comparison genomic hybridization) array

La CGH-array est basée sur le principe de l'hybridation moléculaire compétitive entre ADN de référence et ADN de patient sur un microréseau constitué de fragments d'ADN. La puce à ADN génomique humain utilisée dans ce travail contient 385000 oligonucléotides répartis sur tout le génome en moyenne tous les 6 kb (Nimblegen 385k).

II.4.1 Marquage de l'ADN

Le marquage se fait à partir d'1µg d'ADN. L'ADN à tester est marqué par le fluorochrome Cy3, l'ADN témoin par le fluorochrome Cy5 selon la procédure du kit de marquage de *random priming* (Nimblegen Roche).

II.4.2 Hybridation

Les culots d'ADNs marqués sont ensuite précipités par l'isopropanol, séchés puis réhydratés dans 25 µl d'eau. La concentration est ensuite mesurée et on mélange 4 µg de l'ADN à tester et 4 µg du témoin. Cinq microlitres des culots sont ensuite mélangés avec 13 µl d'une solution d'hybridation (Nimblegen Roche). Ce mélange est dénaturé à 95 ◦C pendant cinq minutes à l'abri de la lumière. Ils sont ensuite déposés sur les lames contenant les oligonucléotides et incubées à 42 ◦C pendant 16 à 20 heures.

II.4.3 Lavage et séchage

Après hybridation, les lames contenant les oligonucléotides hybridées sont décollées à 42°C dans le Wash I (H_2O, wash buffer et DTT dans des concentrations fournies) puis agitées dans ce même wash à température ambiante. Puis les lames sont agitées dans des wash II et III (H_2O, wash buffer et DTT dans des concentrations fournies). Pour terminer, les lames sont centrifugées pendant une minute 1000 tours par minute pour un séchage complet.

II.4.4 Analyse des lames

Les lames hybridées sont analysées avec le scanner Nimblegen MS200 par le logiciel NimbleScan software. Les résultats de l'hybridation des ADNs marqués Cy3 et Cy5 sont scannées séparément à travers deux différents canaux. Ce logiciel détermine l'intensité des signaux fluorescents et normalise l'intensité des ratios Cy5:Cy3 pour chaque lame et chaque point de donnée. SignalMap software permet l'analyse des résultats.Ce logiciel matérialise l'absence d'anomalie chromosomique par une droite correspondant à un rapport égal à 0. Sur le graphique obtenu l'extrémité du bras court est à l'extrême gauche et l'extrémité du bras long à l'extrême droite. Les régions chromosomiques dupliquées correspondent à une augmentation du signal de 3 oligonucléotides successifs (rapport des deux fluorescences supérieur à 0,3) et, inversement, comme étant en défaut (délétion) quand le rapport est inférieur à 0,3.

II.5 Hybridation *in situ*

Des embryons de souris sauvages aux stades E11.5, E 12.5 et E 13.5 ont été collectés, fixés en 4% PFA pendant 4h puis inclus dans une solution sucrose (15%), gélatine (7.5%), PBS 1X. Des coupes de 20 µm sont faites au cryostat.

II.5.1 Synthèse des ribosondes dtna

Une RT-PCR effectuée à partir de cDNA de têtes de souris fœtales 10j et en utilisant les amorces suivantes : RT-mDTNA-A : AGATGAGGGCTCAAGATCTG et RT-mDTNA-B : CAGGGACTTGCTTAATGCATT a permis d'obtenir un fragment PCR de 840 pb allant de l'exon 3 à 10 de dtna, qui a été ensuite cloné dans le vecteur pCRII-TOPO 4.0kb en utilisant les conditions expérimentales indiquées par le fournisseur Invitrogen. L'insertion est encadrée par les promoteurs SP6 et T7. Le plasmide recombinant est digéré par l'enzyme de restriction *BglI*, traitée par la protéinase K et extrait au phénol chloroforme avant d'être utilisé comme matrice pour la synthèse de ribosondes sens et antisens issues respectivement des promoteurs sens (T7) et antisens (SP6) en utilisant les enzymes et

conditions expérimentales du fournisseur ROCHE. Les ribosondes obtenues sont conservées à -20°C en milieu formamide 50%.

II.5.2 Hybridation des lames

La préhybridation des lames est faite par incubation dans les solutions suivantes : 10 min en PFA 4%, 3 rinçages de 3 min en PBS1X suivis de 10 min sous agitation dans une cuve contenant 234 mL d'H_2O avec 3.2 mL de triéthanolamine, 420 µl d'HCl 37% et 600 µl d'anhydride acétique. Elles sont ensuite transférées dans une cuve de Triton X-100 1% PBS1X pendant 30 min suivi de 3 rinçages en PBS1X. L'hybridation est précédée de 2 heures d'incubation des lames avec le tampon d'hybridation en température ambiante. La sonde est diluée au 1/200 dans du tampon d'hybridation puis dénaturée en chauffant 5 min à 80°C. Les lames sont déposées dans une boite humidifiée, le tampon d'hybridation est remplacé par 200µl de sonde recouvert d'une lamelle de verre et laissé à l'étuve à 72°C toute la nuit. Les lamelles sont ensuite délicatement enlevées dans du SSC 5X chaud puis les lames sont rincées 45 min dans du SSC 0.2X à 72°C suivi de 5 min dans du SSC 0.2X à température ambiante et 5 min dans du tampon B1. Les lames sont ensuite recouvertes pendant au moins 1 heure à température ambiante de solution de saturation (10% NGS dans du tampon B1) puis incubées la nuit à température ambiante avec 500 µl d'anticorps anti-dig-AP dilué au 1/5000 (Roche) dans du B1, 1% NGS. Elles sont finalement rincées dans du tampon B1 puis du tampon B3 et révélées avec 500 µl de tampon B4 contenant le NBT-BCIP. La réaction est arrêtée dans du PBS0.1% Tween20 et les lames montées dans du Mowiol.

II.6 Protocole d'immunofluorescence des coupes d'embryons de souris sauvages aux stades E11.5, E12.5 et E13.5.

Les coupes ont été incubées avec 200 µl d'une solution de blocage (PBS 1x, avec 1% de Serum Bovine Foetal (SVF), 0,1% de Triton) pendant 30 min pour l'inhibition des sites non spécifiques de fixation des anticorps. L'anticorps primaire a été ajouté à cette solution et incubé sur la nuit à température ambiante. L'excès d'anticorps a été éliminé par 3 lavages successifs dans du PBS 1x/ 0,025 % Triton de 5 min. Les anticorps secondaires sont ensuite incubés dans cette même solution de saturation avec du 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) pendant 2 heures à température ambiante. Après 3 rinçages successifs de 5 min dans du PBS 1x/ 0,025 % Triton, les lames sont montées au Mowiol. Les anticorps primaires utilisés sont un anticorps anti-β3 tubuline polyclonal de lapin (dilution 1/50, dako ABIN147486), anti-GnRH1 polyclonal de lapin (dilution1/2000, ab517, abcam) et un anti

alpha dystrobrévine monoclonal de souris non spécifique d'une isoforme (1/100, BD Biosciences 610766). Les anticorps secondaires sont un anti-souris Alexa 488 et un anti-lapin Alexa 564 de chez molecular probes.

II.7 PCR/séquençage

Une méthode d'amplification par Polymérase Chain Réaction (PCR) des exons de la région codante des gènes candidats a été faite suivie d'un séquençage direct. Les amorces utilisées sont données dans le tableau 5. 45µl de produits PCR ont été dilués dans 200µl d'eau puis filtrés sur l'appareil Millipore sous vide, ensuite repris dans 20 à 30µl d'eau selon la concentration estimée du produit PCR. Chaque fragment PCR est séquencé en utilisant comme amorce l'une des 2 utilisées au cours de la PCR et à l'aide d'un séquenceur automatique capillaire ABI 3100 (ABI Perkin Elmer).

Exon	Séquences des amorces 5' 3'	Taille (pb)
Pmc1	F: TACATGCCACATTCCTCCAA R: GCAGGAGATTGGAACAGAG	570
	F: TAAGTTCTTGGGTTCTGACC R: TCACTGACTCGCCAAACTCTT	531
Pmc2	F: GATCTGCCAATTCTGGCTT R: TTAGCCATCTTGCTCCACCT	341
1	F: TGCGCAGCAATTTAGGTTAGT R: AGGAACTTAGGATCCTAAGGA	354
2	F: ACAGACCTGTTCAAGTCT R: TTTGTGCCTCATAATACCCCT	386
3	F: GCTGCACACATGTGAGATAC R: ACCAAGTAAGACAGGAAGTGA	389
4	F: CTTGTTGCTGGAAGTACTCC R: GGAATGAGGGAGAGAAAAGG	238
5	F: ATTATGCCAGGAATATTTCAGC R: TCTGAGTATCTGTGACCTGG	405
6	F: GGCAAGTTCTGTTTCTTCAGA R: GAGCCACTAAATAGGCTTCC	354
7	F: CATCTGAAATCGTGGTGCAG R: TGCCCTTTAATTCTGCCACC	375
8	F: CCGAGCATTGAGCAAACTTC R: TTGCTTTTGTGTGGCTCCAG	347
9	F: GGTGCTGCCAGTCATGAATT R: TCCTTGTGAACTGAGTGTACA	299
10	F: GGAAAGGTAGAACCCAGATC R: CCCTTGGCTTGCATGAGAAT	288
11	F: CTTGGATCTAGACTTGGGAG R: ACAGTCTTTCACACACAAAGCA	268
11B	F: TAGGAAGCTCTGCATTCTGC R: ACAACTGTGGTTCACAGAGAA	267
13	F: CTCCTTGTGGTAAAATGACT R: CTTAGCAACAAACACATGCAC	302
14	F: CCTGCCAGAGAATTCTGTTC R: ATGTCTTCCCTTGAGTAGCC	442
15	F: CCTTGATCTGCTCCGATGTT R: CTAAGGTAGCTGAGGACTGT	284
16	F: CTGGTAACCTTGTCAGAGAGAC R: TCTTGAAACAACATGTTGAGG	347
17A	F: CCTAGGATTTCCTCCTGCTT R: TCTGACACCAGCCATGAAAG	411
17B	F: GGAGTGATAGTCACTGAGGT R: CAAACTGAAGCATGAACATAC	273
18	F: TTGTTGTTGTTCTTGTTTCAGG R: GCAGATCTCTAAGAGAGACC	335
19	F: AGGTTGATTTGTGAAGCCTAC R: TGTCACCCCTTCTGAAGGTT	371
20	F: ACAGCTCACACATGAATCCC R: TCTGATTCTGCAAGTCATGTC	295
21	F: AATTCACCAGCTTGACTGCAT R: GAGAAGTGATTGTGAATTCGC	205

Tableau 5: Amorces utilisées pour l'amplification PCR de l'alpha dystrobrévine

II.8 DHPLC

La formation des hétéroduplex est faite en dénaturant les produits PCR pendant 10 minutes à 99°C puis en laissant les renaturations se faire au hasard pendant 50 minutes à 56°C. Les conditions expérimentales utilisées pour l'analyse DHPLC sont données dans le tableau 6.

EXON	Températures utilisées	EXON	Températures utilisée
Exon 1	54,8°C, 56,3°C	Exon 13	58,5°C, 58,8°C
Exon 3	58°C, 59,8°C	Exon 14	59°C
Exon 4	55°C, 56°C, 57,1°C	Exon 15	58,5°C, 59,8°C
Exon 5	54,2°C,56,2°C, 57,8°C	Exon 17	58,5°C, 64°C, 65,4°C
Exon 6	55,8°C, 58°C, 60°C	Exon 17B	58,5°C, 59,1°C
Exon 7	58,7°C, 59,2°C, 60,3°C	Exon 18	57,8°C, 55,5°C
Exon 9	56,6°C	Exon 20	58,7°C, 60,1°C
Exon 10	57°C, 60°C	Exon 21	57,9°C, 61°C
Exon 11B	57,1°C, 57,5°C, 58°C		

Tableau 6: Températures utilisées en DHPLC pour les différents exons de l'alpha dystrobrévine

II.9 Fabrication du minigène

II.9.1 PCR « long range »

La PCR est effectuée à partir de 100ng d'ADN génomique humain en utilisant les amorces DT-8C et DT-10C situées respectivement dans la région 5' de l'exon 8 (codon 293 à 299) et 3' de l'exon 10 de DTNA (codons 354 à 360) en utilisant le kit expand long range PCR (Roche).

Amorces DT-8C : 5'AAATCACCTGCTAAGAAGCTG 3'

Amorce DT-10C : 5'AGGACTTCCTGAGGAGGGA 3'

Le programme PCR utilisé est : 94°C 2min ; 10 cycles 94°C 10sec, 50°C 30sec, 68°C 4 min ; suivi de 22 cycles avec allongement de 20 sec tous les 2 cycles.

20 µl de cette PCR sont déposés sur un gel d'agarose. Le résultat de l'électrophorèse est montré figure 23. L'ADN contenu dans les 30µl restant du produit PCR sont précipités à l'éthanol, resuspendu dans 50 µl d'eau et dosé spectrophotométriquement.

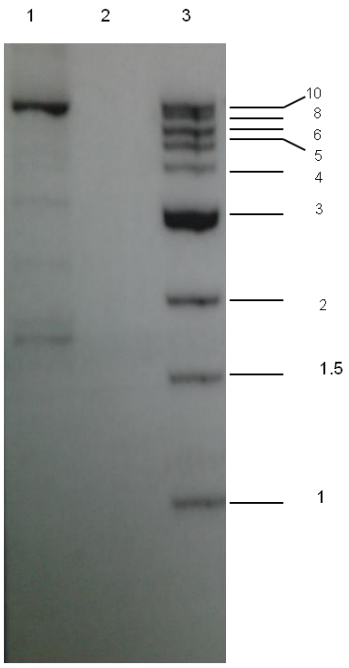


Figure 23: Electrophorèse en gel d'agarose de la PCR « long range ».
1: contenant de 100ng d'ADN génomique humain, 2: sans ADN génomique, 3: Marqueur de PM (Biolabs). Les tailles des fragments sont exprimés en kb.

II.9.2 Clonage du fragment PCR

Le clonage est réalisé dans le vecteur pcDNA3.1/V5His TOPO HA de chez invitrogen est utilisant les conditions expérimentales recommandées par le fabricant et 50 ng du produit de PCR purifié (figure 24). Les clones obtenus sont dans un premier temps sélectionnées en effectuant une PCR interne au fragment cloné (conditions expérimentales d'amplification de l'exon 9 DTNA). Les clones positifs sont ensuite séquencés en utilisant les amorces DT-8C, DT-9A, DT-9B, DT-10A, DT-10C et les oligonucléotides spécifiques du vecteur : promoteur T7 et BGH reverse.

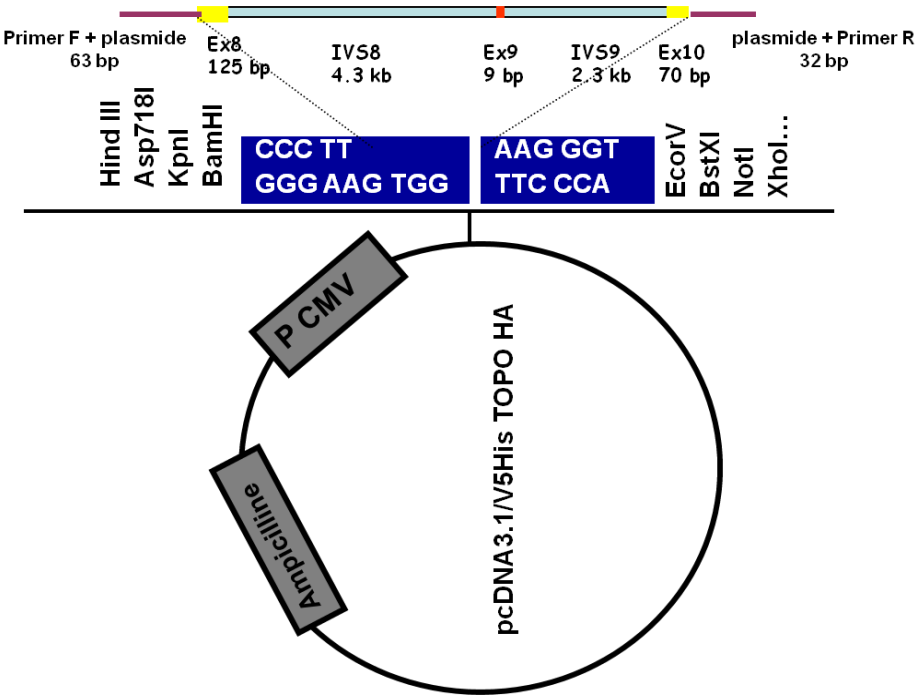


Figure 24: Représentation schématique du minigène comprenant les exons 8, 9 et 10 et les séquences introniques IVS8 et IVS9, sous le contrôle d'un promoteur CMV. Intégration de la séquence génomique de DTNA allant de l'exon 8 à l'exon 10 en aval du promoteur CMV au sein d'un vecteur pcDNA.3.1D/V5.HisTopo. Les flèches rouges situent les 4 mutations identifiées chez nos patients, S311S, I333I, V334I et IVS8-35g>a.

II.9.3 Mutagénèse dirigée

Les mutations trouvées dans la région de l'exon 8 à l'exon 10 de DTNA dans la cohorte de malades KS ont été reproduites dans le plasmide sauvage en utilisant le kit Quichchange II XL site-directed mutagenesis kit, stratagene en utilisant les conditions expérimentales du fabricant.

Cinq minigènes ont été construits contenant la séquence génomique de DTNA de l'exon 8 à l'exon 10 soit les exons 8, 9 et 10 du gène DTNA et les régions introniques les entourants (IVS 8 et IVS 9) et incluant soit la séquence sauvage soit l'un de ses allèles : V334I, S311S, I333I, IVS8-35g>a.

II.10 Transfection du minigène

II.10.1 Lignées cellulaires

Les cellules de la lignée HeLa et de neuroblastomes murins de la lignée Neuro2A ont été cultivées dans du milieu DMEM (Gipco, roche) supplémenté de 10% de SVF.

Toutes les cellules sont cultivées à 37°C dans un incubateur avec 5% CO2 / 95% air. Dans tous les milieux sont ajoutés de la pénicilline (50 U/ml), de la streptomycine (50 µg/ml) et de la fungizone.

II.10.2 Transfection des plasmides

Les cellules HeLa sont transfectées à 50% de confluence, les Neuro2A à 70% le lendemain de l'ensemencement.

Les cellules sont incubées avec une solution de transfection composée de 15 µl de Fugène (Roche), 5 µg de plasmide (rapport 3/1) et de milieu DMEM (Gibco) sans sérum pour atteindre 500 µl de solution finale pour une boite de 10 cm^2. La manipulation s'arrête 24 h après la transfection. Chaque expérience a été tripliquée.

II.11 Préparation des ARN messagers

L'extraction des ARN a été réalisée à partir d'une boite de 10 cm^2 de cellules transfectées la veille. Les cellules sont lysées dans 1 mL de solution de lyse (RNAXEL, eurobio) par boite de culture de 10 cm^2. L'ARN total est extrait par une méthode phénol/chloroforme, selon les instructions du fournisseur et précipité par addition d'isopropanol volume à volume et de RNA bind (Kit RNAXEL, eurobio). Le culot est lavé à l'éthanol 70% puis repris dans 100 à 200 µl d'eau stérile. Les ARN sont dosés par spectrophotométrie UV à 260nm, déposés sur gel d'agarose 1% puis conservés à –80°C. Le rapport A260nm/A280nm doit être compris entre 1,8 et 2.

II.12 Fabrication des ADNc

Un microgramme d'ARN est incubé dans un mélange réactionnel contenant 2µl d'oligo-dT, 2 µl de dNTP (25 mM chacun) dans un volume final de 22 µl au final, mis à 65°C pendant 5 min. Huit µl de tampon RT (invitrogen), 2 µl DTT et 2µl d'inhibiteur de RNases et 2 µl de Murine-Moloney Leukemia Virus (M-MLV) RNase H-Reverse Transcriptase (invitrogen) sont ajoutés et incubés pendant 50min à 37°C, l'enzyme est inactivée à 70°C pendant 10 min. L'ADNc obtenu est conservé à -20°C.

II.13 PCR semi quantitative fluorescente

Le principe de cette PCR est de comparer des profils de fluorescence de différents fragments de taille différente obtenus à partir d'un même échantillon, la quantification des

produits PCR est faite pendant la phase exponentielle de synthèse des produits PCR. Cette PCR est réalisée avec les primers F-6-FAM et R dans 25µl de volume réactionnel. Ces primers sont spécifiques du vecteur (Figure 25).

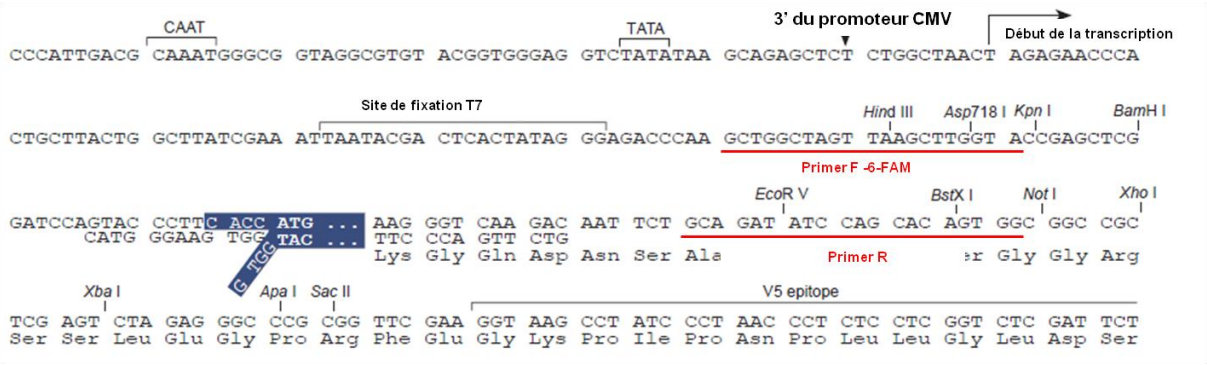


Figure 25: Localisation dans le vecteur des amorces utilisées pour la PCR semi quantitative.

La taille des produits obtenue est de 290 et 299 pb. Les PCR ont été réalisées en triplicat. La dénaturation initiale est faite pendant 15 min à 95°C, suivie de 21 cycles à 95°C pendant 30 s, 55°C pendant 30 s, et 72°C pendant 45 s, et une extension finale de 10 min à 72°C. La quantification est faite après avoir ajoutée au 2 µl du produit PCR 9.8 µl de formamide et 0.2 µl de Genescan-500 Rox size standard (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les produits PCR fluorescents sont dénaturés par chauffage, refroidi sur de la glace et séparé sur un séquenceur capillaire (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Les résultats étaient analysés par le software Genescan 3.7 (Applied Biosystems) afin d'obtenir des électrophorégrammes pour chacun des échantillons (Figure 57). Chaque produit est identifié par sa taille et son intensité. Le total des intensités des 2 fragments représentait 100% de l'intensité puis un % de ce total était attribué à chacun des 2 fragments pour chaque PCR réalisé. La moyenne de ces % (entre n=6 et n=12) est représentée dans la Figure 58 avec la déviation standard.

RESULTATS et DISCUSSION

Chapitre 1 :

Mutations *PROK2* et *PROKR2* chez les patients KS : Etude de corrélation phénotype/génotype, du mode de transmission et de leur prévalence au sein de deux populations.

I Etude de 55 patients KS porteurs de mutations *PROK2* ou *PROKR2*.

Cette première partie porte sur l'étude d'une cohorte de 55 patients KS, 42 hommes et 13 femmes, porteurs pour 9 d'entre eux de mutations *PROK2* et pour 46 autres de mutations de *PROKR2*. Des mutations de *PROK2* et *PROKR2* ont été initialement identifiées comme responsable de KS par notre laboratoire en 2006 (cf. Introduction chapitre III.2.3). Le mode de transmission de ces formes génétiques semblait mixte, soit autosomique récessif soit digénique (cf. Introduction chapitre III.3). Secondairement, l'analyse fonctionnelle des mutations faux sens sur la signalisation de PROKR2 est venue confirmer la responsabilité de ces mutations dans le KS (Monnier et al. 2009). Les résultats de cette analyse sont résumés dans le Tableau 7. En effet, tous les mutants sauf M323I ont une diminution de leur signalisation qui peut être expliquée par différents mécanismes, un défaut d'adressage à la membrane (L173R, W178S, P290S), une abolition de la liaison au ligand (Q210R) ou un défaut de couplage à la protéine Gq (R85C, R85H, R164Q, R268C, V331M). De plus, les expériences de co-transfection de ces mutants avec le récepteur sauvage n'ont pas mis en évidence de modification de l'adressage à la membrane et la signalisation du récepteur sauvage couplé à Gq, ce qui n'est pas en faveur d'un effet dominant négatif de ces mutations *in vivo*.

Mutants Prokr2	Localisation dans la protéine	Adressage à la membrane	Activation de la protéine Gq	Affinité pour Prok2
R85C	i1	normale	diminuée	normale
R85H	i2	normale	diminuée	normale
R164Q	i2	normale	diminuée	normale
L173R	TM4	diminuée	diminuée	normale
W178S	TM4	diminuée	diminuée	NM
Q210R	e2	normale	diminuée	diminuée
R268C	i3	normale	diminuée	normale
P290S	TM6	diminuée	diminuée	NM
M323I	TM7	normale	normale	normale
V331M	TM7	normale	diminuée	normale

Tableau 7 : **Résumé des analyses fonctionnelles des mutations *PROKR2***.
NM : Non mesurable, i : boucle intracellulaire, e : boucle extracellulaire, TM : domaine transmembranaire. D'après (Monnier et al. 2009).

Le premier objectif de notre étude était de rechercher, dans notre cohorte de malades, des signes cliniques associés à ces formes génétiques de la maladie. Nous nous sommes intéressés aux index de masse corporelle (IMC) et au sommeil de nos patients car Prok2 est impliquée dans la régulation des rythmes circadiens et la prise alimentaire et les souris *Prok2-/-* et *Prokr2-/-* ont des anomalies du rythme circadien et de la prise alimentaire (cf. Introduction chapitre III.2.3). Le deuxième objectif était de confirmer l'hypothèse de transmission digénique.

I.1 Signes cliniques associés aux mutations *PROK2* et *PROKR2*

Tous les signes cliniques associés à KS pour ces formes génétiques sont rapportés dans les tableaux 8 et 9 ci-après et Table 2 et 3 de l'article I. Les anomalies classiquement associées aux formes *KAL1* et *FGFR1* de KS étaient rares dans notre série de patients. En effet, aucun cas d'agénésie rénale ni de fente labio-palatine n'a été décrit.

Patients	Sexe	Signes cliniques associés	Génotype *PROK2*
35	M	Aucun	G32R/ +
36	M	Aucun	S54N/ +
37	M	Nystagmus	R73C/ +
38	F	Troubles du sommeil	R73C/ +
55	M	Aucun	R73C/R73C
39	M	Pectus excavatum, palais ogival et surdité bilatérale de perception	H104Y/ +
40"	F	Aucun	G100fsX22/ +
41"	M	Aucun	G100fsX22/ +
54	M	Aucun	I55fsX1/ I55fsX1

Tableau 8 : Signes associés chez des patients KS porteurs de mutations *PROK2*.
Le signe" signifie que les patients appartiennent à la même famille.

Il y avait dans notre série de patients mutés *PROK2* un cas de surdité bilatérale de perception (H104Y/+), les causes génétiques de surdité n'ont pas été recherchées chez ce malade. Dans notre série de patients mutés *PROKR2*, il y avait un cas d'hypodontie (R85C/+) et un cas de syncinésie bimanuelle (R85H/+). La mutation de *PROK2* (H104Y/+) associée à une surdité n'a été détectée que chez un seul malade. En revanche, 5 malades étaient porteurs de mutation R85C dont un à l'état homozygote et 4 malades de mutation R85H dont un à l'état homozygote. Aucun autre de ces malades ne présentait de syncinésie controlatérale d'imitation ou d'hypodontie.

Patients	Sexe	Signes cliniques associés	Génotype *PROKR2*
1	M	Hypodontie	R85C/ +
2	M	Aucun	R85C/ +
3	F	Aucun	R85C/ +
42	M	Aucun	R85C/ R85C
4	M	Aucun	R85G/ +
5#	M	Troubles du sommeil, syncinésies bimanuelles	R85H/ +
6#	M	Troubles du sommeil	R85H/ +
7*	F	Aucun	R85H/ +
8*	F	Palais ogival	R85H/ +
43	F	Aucun	R85H/ R85H
9	M	Aucun	R85L/ + , *FGFR1*: A604T/ +
10	M	Dysmorphie faciale	R164Q/ +
44	F	Aucun	R164Q/T330fsX5
11	M	Aucun	L173R/ +
12	F	Aucun	L173R/ +
13	M	Aucun	L173R/ +
14	M	Aucun	L173R/ +
15	F	Ptosis, palais ogival	L173R/ +
16	M	Dépression sévère	L173R/ +
17	M	Brachydactilie et polydactilie	L173R/ +
18	M	Aucun	L173R/ +
19	M	Aucun	L173R/ +
20	M	Palais ogival, troubles psychomoteurs	L173R/ +
45	M	Aucun	L173R/ L173R
46	M	Aucun	L173R/ L173R
21	M	Aucun	L173R/ + , *KAL1*: S396L
22	M	Aucun	L173R/ + , *KAL1*: R423X
23	F	Défaut du septum interventriculaire	W178S/ +
24^	M	Aucun	Q210R/ +
25^	M	Aucun	Q210R/ +
47^	M	Aucun	Q210R/L173R
48^	M	Aucun	Q210R/L173R
49^	M	Aucun	Q210R/L173R
26	M	Aucun	W251L/ +
27	M	Aucun	R268C/ +
28	M	Macroadénome hypophysaire non sécrétant	R268C/ +; *KISS1R*: A189T/ +
29	M	Aucun	P290S/ +
30	M	Aucun	P290S/ +
31	M	Troubles du sommeil rapportés	P290S/ +
32	M	Aucun	P290S/ +
33	F	Aucun	P290S/ +
50	F	Aucun	P290S/P290S
51	F	Aucun	P290S/P290S
34	M	Diabète, ptosis	V331M/ + , *GNRHR*: R240Q/+
52α	M	Aucun	M323I/ H20fsX24
53α	M	Aucun	M323I/ H20fsX24

Tableau 9: Signes associés chez des patients KS porteurs de mutations *PROKR2*.
Les signes $^{\#}$,*,^,$^{\alpha}$ signifient que les patients appartiennent à la même famille.

Malgré le rôle anorexigène de PROK2 dans le comportement alimentaire murin (cf. Introduction chapitre III.2.3), nous n'avons pas trouvé de différence entre l'IMC moyen des patients porteurs de mutations *PROK2* ou *PROKR2* et ceux sans mutation.

Quatre de nos patients se plaignaient de troubles du sommeil (*PROKR2* R85H/+, R85H/+, P290S/+ et *PROK2* R73C/+). Dans notre série, d'autres malades KS possèdent ces mêmes mutations sans souffrir de trouble du sommeil. Des anomalies infra-cliniques peuvent exister mais il ne semble pas que ces mutations soient spécifiquement liées à ce signe clinique. Nous avons aussi pu mesurer le cycle plasmatique du cortisol, toutes les 4h, chez 5 patients porteurs de mutations de *PROK2* ou *PROKR2* (*PROK2* : R73C/+ ; *PROKR2* : R85H/+, P290S/+, P290S/+ et L173R/L173R) dont 3 se plaignant de troubles du sommeil, sans retrouver d'anomalie (Figure 26).

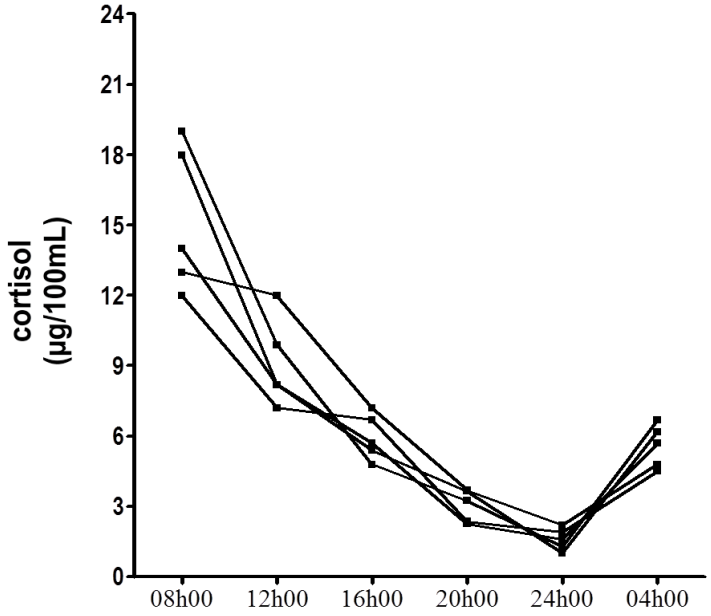


Figure 26 : Cycle du cortisol de 5 patients mutés *PROK2* ou *PROKR2*.

Les autres signes additionnels dans la série de patients mutés *PROK2* étaient la présence d'un nystagmus (R73C/+) et d'un palais ogival associé à un pectus excavatum chez le patient H104Y/+ (Tableau 8). Dans le groupe de patients mutés *PROKR2*, 3 patients avaient 1 palais ogival (R85H/+, L173R/+, L173R/+), 1 patient avait une dysmorphie faciale (R164Q/+), 2 patients avaient un ptosis (L173R/+, V331M/+), 1 patient avait une dépression sévère (L173R/+), 1 patient avait une brachydactilie de la main droite et une polydactilie des pieds (L173R/+), 1 patiente un défaut du septum interventriculaire (W178S/+), 1 patient un macroadénome hypophysaire non sécrétant (R268C/+), 1 patient un diabète (V331M/ +). Aucun de ces signes cliniques n'était récurrent chez des patients d'un génotype défini.

I.2 Analyse du phénotype KS des patients mutés *PROK2* et *PROKR2*

Nous avons comparé les phénotypes des patients KS porteurs de mutations *PROK2* ou *PROKR2* monoallélique (34 patients avec des mutations *PROKR2* et 7 patients avec des mutations *PROK2*) ou biallélique (12 patients bialléliques porteurs de mutations *PROKR2* et 2 patients de mutations *PROK2*). Le phénotype reproductif clinique masculin est plus sévère dans le groupe biallélique avec une plus grande prévalence de cryptorchidie (70 *vs* 34%, p<0.05), de micropénis (90% *vs* 28%, p<0.01), et un plus petit volume testiculaire moyen (1.2±0.4ml *vs* 4.5±6.0ml, p<0.01). De façon parallèle, les valeurs biologiques des taux de testostérone plasmatique, de FSH de base et de LH après stimulation sont plus diminuées dans le groupe biallélique (0.2±0.1 *vs* 0.7±0.8 ng/ml, p=0.05 ; 0.3±0.1 *vs* 1.8±3.0 UI/l, p<0.05 ; 0.8±0.8 *vs* 5.2±5.5 UI/l, p<0.05). Cette comparaison n'a pu être faite que chez les hommes car les femmes du groupe biallélique n'étaient pas assez nombreuses pour permettre une comparaison. Cependant, les phénotypes reproductifs les plus sévères (aménorrhée primaire et absence de développement mammaire) sont présents chez les 4 femmes du groupe biallélique porteuse de mutations *PROKR2* (R164Q/T330fsX5, R85H/R85H, P290S/P290S). Ainsi, dans notre cohorte, les 10 hommes et les 4 femmes porteurs de mutation biallélique de *PROK2* ou *PROKR2* avaient, uniformément un phénotype reproductif sévère. En revanche, les phénotypes reproductifs des patients porteurs de mutation monoallélique étaient plus hétérogènes. De la même façon, une hétérogénéité de l'atteinte olfactive est observée dans le groupe monoallélique (Tableau 10 et Table 2 et 2 de l'article I).

Odorat/IRM BO	Génotype
	PROKR2
Hyposmie (I/A)	R85C/ +
Anosmie (I/A)	R85C/ +
Normosmie (I/ND)	R85C/ +
Anosmie (I/A)	R85G/ +
Normosmie (I/ND)	R85H/ +
Normosmie (I/ND)	R85H/ +
Hyposmie (O/A)	R85H/ +
Hyposmie (O/A)	R85H/ +
Anosmie (O/ND)	R85L/ +, *FGFR1*: A604T/+
Hyposmie (I/A)	R164Q/ +
Anosmie (I/ND)	L173R/ +
Anosmie (O/ND)	L173R/ +
Hyposmie (I/Hyp)	L173R/ +
Anosmie (I/A)	L173R/ +
Anosmie (I/ND)	L173R/ +
Anosmie (I/ND)	L173R/ +
Hyposmie (I/Hyp)	L173R/ +
Normosmie (I/HypG)	L173R/+
Anosmie (I/N)	L173R/ +
Anosmie (I/A)	L173R/ +
Hyposmie (O/A)	L173R/ +, *KAL1*: S396L
Hyposmie (I/ND)	L173R/ +, *KAL1*: R423X
Hyposmie (I/ND)	W178S/ +
Anosmie (I/A)	Q210R/ +
Anosmie (I/ND)	Q210R/ +
Anosmie (O/Hyp)	W251L/ +
Anosmie (I/A)	R268C/ +
Anosmie (I/Hyp)	R268C/ +, *KISS1R*:A189T/+
Anosmie (O/ND)	P290S/ +
Hyposmie (I/ND)	P290S/ +
Anosmie (O/A)	P290S/ +
Anosmie (I/N)	P290S/ +
Hyposmie (I/ND)	P290S/ +
Anosmie (I/A)	V331M/ +, *GNRHR*:R240Q/+

Odorat/IRM BO	Génotype
	PROK2
Normosmie (I/ND)	G32R/ +
Anosmie (O/Hyp)	S54N/ +
Anosmie (I/Hyp)	R73C/ +
Anosmie (I/ND)	R73C/ +
Anosmie (O/ND)	H104Y/ +
Anosmie (O/A)	G100fsX22/ +
Normosmie (O/ND)	G100fsX22/ +

Odorat/IRM BO	Génotype
	PROKR2
Hyposmie (I/Hyp)	R85C/ R85C
Anosmie (I/ND)	R85H/ R85H
Anosmie (I/ND)	R164Q/T330fsX5
Anosmie (I/A)	L173R/ L173R
Hyposmie (I/A)	L173R/ L173R
Anosmie (I/ND)	Q210R/L173R
Anosmie (I/ND)	Q210R/L173R
Anosmie (I/ND)	Q210R/L173R
Anosmie (O/Hyp)	P290S/P290S
Anosmie (O/A)	P290S/P290S
Hyposmie (I/A)	M323I/ H20fsX24
Anosmie (I/ND)	M323I/ H20fsX24
	PROK2
Anosmie (I/A)	I55fsX1/ I55fsX1
Anosmie (I/A)	R73C/R73C

Tableau 10 : **Atteinte olfactive en fonction du génotype *PROK2* et *PROKR2*.**
A gauche, les patients ayant des mutations monoalléliques de *PROKR2*, en haut à droite, des mutations monoalléliques de *PROK2*, en bas à droite des mutations bialléliques de *PROKR2* ou *PROK2*. Abréviations : BO, bulbe olfactif ; I, interrogatoire ; O, olfactométrie ; A, aplasie des bulbes olfactifs; Hyp, hypoplasie ; ND, non disponible.

L'altération de l'odorat (anosmie ou hyposmie) est présente chez tous les patients porteurs de mutation biallélique *PROK2* et *PROKR2* et apparemment absent chez 15% des patients porteurs de mutation monoallélique *PROK2* et *PROKR2*. Il existe ainsi une hétérogénéité phénotypique des patients porteurs de mutation monoallélique *PROK2* et *PROKR2*.

Dans le groupe monoallélique, une mutation qui atteint sévèrement la signalisation PROKR2 (Monnier et al. 2009) au cours des analyses fonctionnelles ne semble pas renforcer la sévérité du phénotype gonadotrope et des signes associés. Ainsi, la comparaison des 7 hommes porteurs de mutations sévères de *PROKR2* à l'état hétérozygote, 1 R164Q/+, 2 Q210R/+, 4 P290S/+ (groupe 2) et de l'ensemble des patients porteurs de mutations hétérozygotes de *PROK2* ou *PROKR2* (groupe 1) n'a pas mis en évidence de différence significative. Cliniquement, la proportion d'impubérisme, de cryptorchidie et de micropénis n'était pas différente entre les groupes (71% *vs* 84%, p=0.6 ; 43% *vs* 34%, p=0.7 ; 28% *vs* 28%, p=1.0). Le volume testiculaire (2.6± 1.6 *vs* 4.5± 6.0, p=0.3), le taux de testostérone (1.0± 1.6 *vs* 0.7± 0.8, p=0.9), le taux de LH et FSH de base et sous stimulation (0.8± 1.3 *vs* 0.7± 1.0, p=0.7 ; 2.8± 5.5 *vs* 1.8± 3.0, p=0.9 ; 2.7± 4.4 *vs* 5.2± 5.5, p=0.2 ; 2.1± 0.9 *vs* 3.6± 2.7, p=0.2) n'étaient également pas différents (Figure 27).

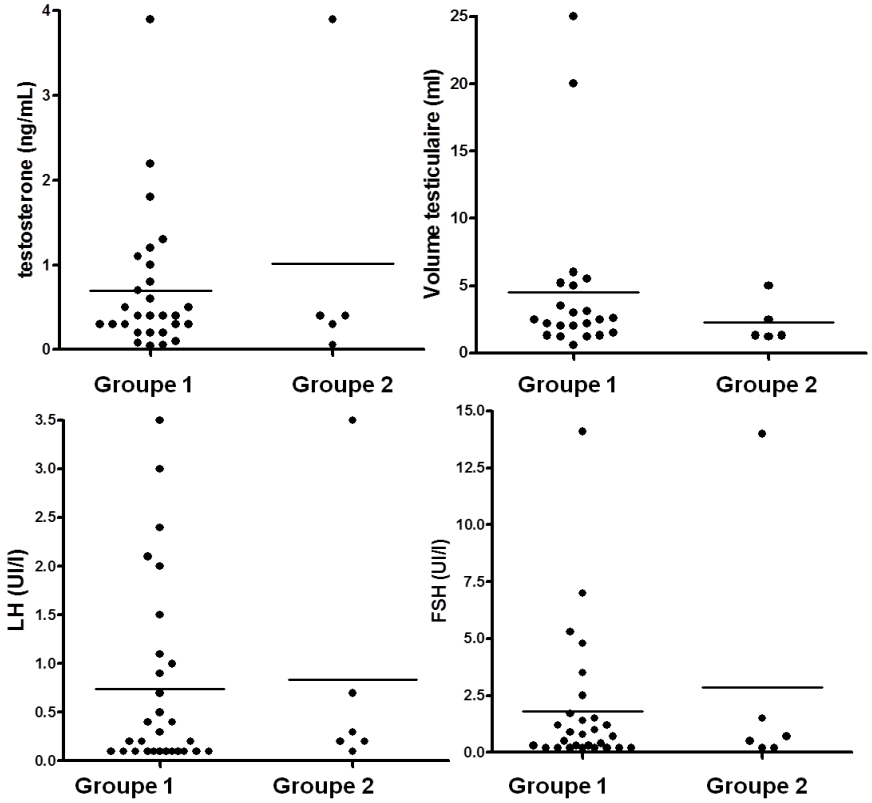


Figure 27: Comparaison du phénotype gonadotrope du groupe d'hommes porteurs de mutation monoallélique *PROK2* ou *PROKR2* (Groupe 1) et des hommes porteurs de mutation *PROKR2* affectant sévèrement la signalisation Gq de PROKR2 (R164Q/+, Q210R/+, P290S/+) (Groupe 2).

Ces 7 patients ne présentaient que peu de signes associés (1 dysmorphie faciale modérée et 1 cas de troubles du sommeil).

I.3 Transmission digénique ou oligogénique des mutations *PROK2* et *PROKR2*

Cinq de nos patients possèdent des mutations hétérozygotes dans 2 gènes KS ou 1 gène KS et un gène d'HH normosmique : *PROKR2* et *KAL1*, *PROKR2* et *FGFR1, PROKR2* et *KISS1R, PROKR2* et *GNRH1R* détaillées dans le tableau 11.

Génotype du 1er gène	Effets *in vitro*	Génotype du 2ème gène	Effets *in vitro*	Polyphen	Phénotype	IRM BO
PROKR2 : L173R/+	↘	*KAL1* : S396L/+	NT	0.6 possibly damaging	KS	Ap
PROKR2 : L173R/+	↘	*KAL1* : R423X/+	Absence de protéine N		KS	ND
PROKR2 : R85L/+	↘	*FGFR1* : A604T/+	NT	0.99 probably damaging	KS	ND
PROKR2 : V331M/+	↘	*GnRHR* : R240Q/+	↘		KS	Ap
PROKR2 :R268C/+	↘	*KISS1R* : A189T/+	NT	0.01 benign	KS	Hyp

Tableau 11: Génotype et phénotype des 5 patients ayant une transmission digénique
NT : non testés.

Quelque soit la mutation associée, le phénotype de nos patients est un KS confirmé par des anomalies des structures olfactives dans les 2 cas de mutation *PROKR2* associée à des mutations de gènes normosmiques.

Les 5 patients digéniques ont une proportion moins importante d'impubérisme, de cryptorchidie et de micropénis que les patients porteurs de mutations bialléliques (100% *vs* 40%, p=0.09 ; 70% *vs* 40%, p=0.3 ; 90% *vs* 40%, p=0.08). Leurs volumes testiculaires (17.0± 9.8 *vs* 1.2± 0.4, p=0.007), leurs taux de testostérone (1.3± 0.7 *vs* 0.2±0.1, p<0.001), leurs taux de LH et de FSH de base (1.4± 1.2 *vs* 0.3±0.4, p=0.1 ; 4.4± 2.8 *vs* 0.3± 0.1, p<0.01) sont plus élevés que ceux des patients du groupe biallélique. Le phénotype gonadotrope des 5 patients digéniques est moins sévère que celui des patients porteurs de mutations monoalléliques ou bialléliques de *PROK2* ou *PROKR2*.

Chez 1 seul de nos 5 patients digéniques, le KS était familial permettant l'étude de la ségrégation du génotype digénique avec le phénotype (Figure 28). Il s'agissait du patient qui associait une mutation L173R/+ de *PROKR2* à une mutation R423X de *KAL1*.

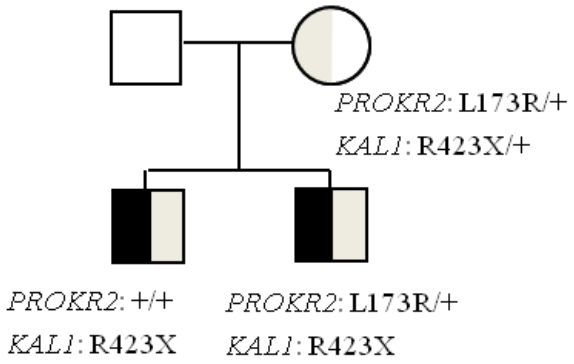


Figure 28: Arbre généalogique d'une famille KS associant mutation *PROKR2* et *KAL1*
La moitié droite des symboles reflète l'olfaction (gris: hyposmie, noir: anosmie), la moitié gauche l'atteinte gonadotrope (gris: retard pubertaire, noir: HH).

Article I

A comparative phenotypic study of kallmann syndrome patients carrying monoallelic and biallelic mutations in the prokineticin 2 or prokineticin receptor 2 genes.

Julie SARFATI, Anne GUIOCHON-MANTEL, Philippe RONDARD, Isabelle ARNULF, Alfons GARCIA-PINEIRO, Slawomir WOLCZYNSKI, Sylvie BRAILLY-TABARD, Maud BIDET, Ramos ARROYO, Michèle MATHIEU, Anne LIENHARDT-ROUSSIE, Graeme MORGAN, Zinet TURKI, Catherine BREMONT, James LESPINASSE, Hélène Du BOULLAY, Nathalie CHABBERT-BUFFET, Sébastien JACQUEMONT, Gérard REACH, Nicole De TALENCE, Paolo TONELLA, Bernard CONRAD, Francois DESPERT, Bruno DELOBEL, Thierry BRUE, Claire BOUVATTIER, Sylvie CABROL, Michel PUGEAT, Arnaud MURAT, Philippe BOUCHARD, Jean-Pierre HARDELIN, Catherine DODÉ*, and Jacques YOUNG*.

A Comparative Phenotypic Study of Kallmann Syndrome Patients Carrying Monoallelic and Biallelic Mutations in the Prokineticin 2 or Prokineticin Receptor 2 Genes

Julie Sarfati, Anne Guiochon-Mantel, Philippe Rondard, Isabelle Arnulf, Alfons Garcia-Piñero, Slawomir Wolczynski, Sylvie Brailly-Tabard, Maud Bidet, Maria Ramos-Arroyo, Michèle Mathieu, Anne Lienhardt-Roussie, Graeme Morgan, Zinet Turki, Catherine Bremont, James Lespinasse, Hélène Du Boullay, Nathalie Chabbert-Buffet, Sébastien Jacquemont, Gérard Reach, Nicole De Talence, Paolo Tonella, Bernard Conrad, Francois Despert, Bruno Delobel, Thierry Brue, Claire Bouvattier, Sylvie Cabrol, Michel Pugeat, Arnaud Murat, Philippe Bouchard, Jean-Pierre Hardelin, Catherine Dodé,* and Jacques Young*†

Context: Both biallelic and monoallelic mutations in *PROK2* or *PROKR2* have been found in Kallmann syndrome (KS).

Objective: The objective of the study was to compare the phenotypes of KS patients harboring monoallelic and biallelic mutations in these genes.

Design and Patients: We studied clinical and endocrine features that reflect the functioning of the pituitary-gonadal axis, and the nonreproductive phenotype, in 55 adult KS patients (42 men and 13 women), of whom 41 had monoallelic mutations and 14 biallelic mutations in *PROK2* or *PROKR2*.

Results: Biallelic mutations were associated with more frequent cryptorchidism (70% *vs.* 34%, $P < 0.05$) and microphallus (90% *vs.* 28%, $P < 0.001$) and lower mean testicular volume (1.2 ± 0.4 *vs.* 4.5 ± 6.0 ml; $P < 0.01$) in male patients. Likewise, the testosterone level as well as the basal FSH level and peak LH level under GnRH-stimulation were lower in males with biallelic mutations (0.2 ± 0.1 *vs.* 0.7 ± 0.8 ng/ml; $P = 0.05$, 0.3 ± 0.1 *vs.* 1.8 ± 3.0 IU/liter; $P < 0.05$, and 0.8 ± 0.8 *vs.* 5.2 ± 5.5 IU/liter; $P < 0.05$, respectively). Nonreproductive, nonolfactory anomalies were rare in both sexes and were never found in patients with biallelic mutations. The mean body mass index of the patients (23.9 ± 4.2 kg/m^2 in males and 26.3 ± 6.6 kg/m^2 in females) did not differ significantly from that of gender-, age-, and treatment-matched KS individuals who did not carry a mutation in *PROK2* or *PROKR2*. Finally, circadian cortisol levels evaluated in five patients, including one with biallelic *PROKR2* mutations, were normal in all cases.

Conclusion: Male patients carrying biallelic mutations in *PROK2* or *PROKR2* have a less variable and on average a more severe reproductive phenotype than patients carrying monoallelic mutations in these genes. Nonreproductive, nonolfactory clinical anomalies associated with KS seem to be restricted to patients with monoallelic mutations. (***J Clin Endocrinol Metab*** **95: 659–669, 2010)**

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in U.S.A.
Copyright © 2010 by The Endocrine Society
doi: 10.1210/jc.2009-0843 Received April 20, 2009. Accepted November 16, 2009.
First Published Online December 18, 2009
* C.D. and J.Y. contributed equally to this work.
† Author Affiliations are shown at the bottom of the next page.

Abbreviations: BMI, Body mass index; CV, coefficient of variation; FGF, fibroblast growth factor; FGFR1, FGF receptor 1; GNRHR, GnRH receptor; HH, hypogonadotropic hypogonadism; KISS1R, kisspeptin receptor; KS, Kallmann syndrome; MRI, magnetic resonance imaging.

Downloaded from jcem.endojournals.org at INSERM DISC DOC on February 18, 2010

Kallmann syndrome (KS) is a developmental disorder combining congenital hypogonadotropic hypogonadism (HH) with anosmia or hyposmia (1). The deficiency of the sense of smell is related to olfactory bulb hypoplasia or aplasia. HH is due to GnRH deficiency (2), which likely results from the failed embryonic migration of neuroendocrine GnRH-synthesizing cells (3). KS is genetically heterogeneous. In 1991 *KAL1*, encoding an extracellular matrix glycoprotein, was implicated in the X chromosome-linked form of KS (4–6). In 2003 we showed that the fibroblast growth factor receptor 1 (*FGFR1*) gene was involved in an autosomal dominant form of KS (7). More recently Falardeau *et al.* showed that the gene encoding fibroblast growth factor (FGF)-8, a ligand of FGFR1, was also involved in a few KS cases (8). Mutations in the chromodomain helicase DNA-binding protein 7 gene (*CHD7*), which underlie coloboma, heart defect, choanal atresia, retardation, genital hypoplasia, ear anomalies (CHARGE) syndrome, have also been reported in a few patients initially diagnosed with KS (9, 10).

In 2006 we identified, in several KS patients, mutations in *PROK2* (National Center for Biotechnology Information gene ID 60675; Bethesda, MD) or *PROKR2* (National Center for Biotechnology Information gene ID 128674) that encode prokineticin-2 and prokineticin receptor-2 (a G protein-coupled receptor), respectively (11). Since then, we and others reported on the presence of *PROKR2* or *PROK2* mutations (mainly missense but also nonsense and frameshift mutations) in additional patients (12–16). Most patients carry monoallelic mutations, but some patients carry mutations on both alleles of either gene. Moreover, most of the mutations identified in homozygous (or compound heterozygous) patients have also been found in heterozygous state in other patients (11, 12, 15 and this study). Finally, many of the mutations reported so far, whose deleterious effects on the receptor signaling activity are predicted or have been confirmed by *in vitro* studies (12, 14, 17), are also present in some clinically unaffected individuals [(11, 12), and C. Dodé unpublished results)]. This, together with the observation that only homozygous null mice for *Prok2* or *Prokr2* reproduce the KS phenotype (12, 18) strongly suggests that heterozygous patients carry additional mutations in other KS genes. Accordingly, we did not find a dominant-negative effect of any of the *PROKR2* missense mutations on the wild-type receptor *in vitro* (17). Therefore, *PROK2* and *PROKR2* are likely to be involved both in recessive monogenic and digenic/oligogenic forms of KS (1). Digenic inheritance has indeed been shown in a few patients who bear mutations both in *PROKR2* and *PROK2*, *KAL1*, or *FGFR1* (11, 14 and this study). Notably, a few additional patients have been found to carry mutations in both *PROKR2* and the GnRH1, GnRH receptor (GNRHR), or kisspeptin receptor (KISS1R) genes that have been implicated in normosmic congenital HH (19 and this study). Most patients heterozygous for *PROKR2* or *PROK2* mutations, however, are expected to carry additional mutations in as-yet-undiscovered KS genes. Indeed, mutations in the KS genes identified so far have been found in less than 30% of all KS patients, indicating that other disease genes remain to be discovered (1). Because these genes, when mutated, may cause variable degrees of reproductive and olfactory dysfunction, as well as diverse nonreproductive, nonolfactory anomalies [as previously shown for *KAL1*, *FGFR1*, and *FGF8* (1)], some clinical heterogeneity can be anticipated among KS patients harboring monoallelic *PROKR2* or *PROK2* mutations, depending on the other gene(s) implicated in each patient. In contrast, patients carrying biallelic mutations in *PROKR2* or in *PROK2*, which may be sufficient to cause the KS phenotype as suggested by *Prokr2* and *Prok2* mouse mutants, could have less variable phenotypes. To test this hypothesis, we conducted a comparative phenotypic study

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 567 (J.S., C.D.), Département de Génétique et Développement, Institut Cochin, Université Paris-Descartes, Service d' Endocrinologie Pédiatrique (C.Bo.), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Vincent-de-Paul, and Service d'Endocrinologie (C.Br.) and Laboratoire de Biochimie et de Génétique Moléculaire (C.D.), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, F-75014 Paris, France; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 693 (A.G.-M., S.B.-T., J.Y.), Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique, et Hormonologie, Université Paris-Sud 11, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, F-94275 Le Kremlin Bicêtre, France; Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5203 (P.R.), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 661, Institut de Génomique Fonctionnelle, Universités de Montpellier 1,2, F-34967 Montpellier, France; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche 975 (I.A.), Unité de Pathologie du Sommeil, and Service d'Endocrinologie (M.B.), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Hôpital Pitié-Salpêtrière, F-75634 Paris, France; Servei ORL (A.G.-P.), Department of Reproduction and Gynecological Endocrinology (S.W.), Bialystok, Poland; Servicio de Genética (M.R.-A.), Hospital Virgen del Camino, 31008 Pamplona, Spain; Département de Pédiatrie (M.M.), Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens, F-80054 Amiens, France; Service d'Endocrinologie Pédiatrique (A.L.-R.), Centre Hospitalier Universitaire Limoges, F-87042 Limoges, France; Sydney IVF (G.M.), NSW 2000 Sydney, Australia; Service d' Endocrinologie (Z.T.), Institut National de Nutrition, 1007 Tunis, Tunisia; Laboratoire de Génétique Chromosomique (J.L.) and Service d'Endocrinologie (H.D.B.), Centre Hospitalier Universitaire Chambéry, 73000 Chambéry, France; Service de Gynécologie Obstétrique (N.C.-B.), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Tenon, F-75970 Paris, France; Service de Génétique Médicale (S.J.), Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, CH-1011 Lausanne, Switzerland; Service d' Endocrinologie (G.R.), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Avicenne, F-93009 Bobigny, France; Service d' Endocrinologie (N.D.-T.), Centre Hospitalier, Nancy-Brahois, France; Universitätsklinik für Kinderheilkunde Inselspital (P.T., B.C.), Bern, Switzerland; Unité d'Endocrinologie (F.D.), Croissance, Diabétologie, Centre Hospitalier Universitaire Tours, F-37044 Tours, France; Laboratoire de Génétique Médicale (B.D.), Hôpital Jeanne de Flandre, F-59037 Lille, France; Service d' Endocrinologie (T.B.), APHM, Marseille, France; Service d'Endocrinologie (S.C.), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Trousseau, F-75571 Paris, France; Service d' Endocrinologie (M.P.), Centre Hospitalier Universitaire de Lyon, F-69622 Lyon, France; Service d'Endocrinologie (A.M.), Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, F-44000 Nantes, France; Service d'Endocrinologie et Reproduction (P.B.), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, F-75012 Paris, France; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMRS 587 (J.-P.H.), Département de Neuroscience, Institut Pasteur, F-59021 Paris, France; and Service d'Endocrinologie et Maladies de la Reproduction and Centre de Référence des Maladies Endocriniennes Rares de la Croissance (J.Y.), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, F-94275 Le Kremlin Bicêtre, France

in 55 KS patients who carry either monoallelic or biallelic mutations in *PROK2* or *PROKR2*.

Patients and Methods

Patients

From a cohort of approximately 600 KS patients who have been screened for the presence of *PROK2* or *PROKR2* mutations, the 55 patients (42 men and 13 women) carrying either monoallelic (41 patients) or biallelic (14 patients) mutations in *PROK2* or *PROKR2* were selected for this study. Twenty-seven of these patients have been previously reported (11, 15), whereas the remaining 28 patients have not. In all KS patients carrying *PROK2* or *PROKR2* monoallelic mutations, additional mutations in *KAL1*, *FGFR1*, *FGF8*, *GNRHR*, *GNRH1*, *KISS1R*, *KISS1*, TAC3R, or *TAC3* were searched for as described elsewhere (7, 8, 20–24). In addition, we sought mutations in *CHD7* in the KS patients who had a heart defect or hearing impairment (patients 23 and 39), *i.e.* two clinical anomalies that can be found in the CHARGE syndrome. Table 1 provides a list of all the mutations identified in the patients.

Gonadotropin deficiency in the patients was characterized by: 1) absent or incomplete puberty at age 18 yr; 2) low plasma testosterone levels in men and low estradiol levels in women plus low or normal serum gonadotropin levels; 3) otherwise normal pituitary function; 4) normal serum ferritin concentrations; and 5) normal magnetic resonance imaging (MRI) of the hypothalamic-pituitary region.

Spontaneous sexual maturation was assessed through a detailed history taking (virilization in males, breast development and menses in females and growth spurt in both gender), and physical examination. In males, stretched penile length was measured at diagnosis before any androgen or gonadotropin therapy; microphallus was defined as a length less than 2.5 cm (25). Testicular volume was evaluated before any treatment in 10 patients with biallelic mutations and 22 patients with monoallelic mutations by using both a Prader orchidometer and ultrasonography. None of the patients had received gonadotropin replacement therapy before this study. Patients who were receiving androgen replacement therapy were taken off testosterone enanthate for at least 2 months before hormonal investigations. On the day of admission, a blood sample was drawn between 0800 and 1000 h and stored until baseline serum FSH, LH, and plasma testosterone assays in males and estradiol assay in females. Analysis of gonadotropin secretion was carried out using the GnRH challenge test (100 μg iv) as reported (22, 26).

Olfactory acuity was assessed by interview in all patients and analyzed by olfactometry (27) in 15 patients. In addition, 30 patients underwent MRI of the olfactory bulb region. In all patients, bimanual synkinesia and hypodontia were searched for by clinical examination. In addition, four patients had dental panoramic x-ray. Renal ultrasound examination was performed in 29 patients. One patient underwent continuous sleep monitoring during 48 h as described (28). Finally, in five KS patients, plasma cortisol level was measured in serial blood samples taken at 0800, 1200, 1600, 2000, 2400 and 0400 h, and values were compared with values in 12 healthy volunteers.

TABLE 1. List of the mutations found in the patients

Gene	Exon	Nucleotide change	Amino acid change
PROKR2	1	c.58delC	p.20fsX24
	1	c.253C>T[a]	p.R85C
	1	c.253C>G[a]	p.R85G
	1	c.254G>A	p.R85H
	1	c.254G>T[a]	p.R85L
	2	c.491G>A	p.R164Q
	2	c.518T>G	p.L173R
	2	c.533G>C	p.W178S
	2	c.629A>G	p.Q210R
	2	c.752G>T[a]	p.W251L
	2	c.802C>T	p.R268C
	2	c.868C>T	p.P290S
	2	c.969G>A	p.M323I
	2	c.989delC[a]	p.T330fsX5
	2	c.991G>A	p.V331M
PROK2	1	c.94G>C	p.G32R
	2	c.161G>A[a]	p.S54N
	2	c.163delA	p.I55fsX1
	2	c.217C>T	p.R73C
	4	c.297-299insT	p.G100fsX22
	4	c.310C>T[a]	p.H104Y
KAL1[b]	8	c.1187C>T	p.S396L
	9	c.1267C>T	p.R423X
FGFR1[b]	13	c.1810G>A[a]	p.A604T
GNRHR[b]	2	c.719G>A[a]	p.R240Q
KISS1R[b]	4	c.565G>A	p.A189T

[a] New sequence variants.

[b] These five mutations were found in five patients who also carry monoallelic mutations in *PROKR2*. The pathogenic effects of the *KAL1* mutations have been previously discussed (11, 20). The missense mutation in *FGFR1* is located in the tyrosine kinase domain of the receptor and presumably interferes with its enzymatic activity. The missense mutation in *GNRHR* is located in the third intracellular loop of this G protein-coupled receptor and has both a deleterious effect on the intracellular release of Ca^{2+} *in vitro* and a lower amount of the receptor at the cell surface (<50% of that of wild-type receptor, see supplemental Fig. S1). Finally, the missense mutation in *KISS1R* has already been reported both in a patient with normosmic congenital HH and clinically unaffected individuals (33). It is located in the second extracellular loop of this G protein-coupled receptor and may thus interfere with ligand binding.

The study was approved by the local ethics committee, and the patients and controls included gave their written informed consent to participate.

Hormone measurements

All the hormone measurements were performed in a single run. Plasma LH, FSH, and inhibin B levels were measured with immunoradiometric assay or ELISAs, as reported elsewhere (21, 26, 29). The intra- and interassay coefficients of variation (CVs) were, respectively, 1.5 and 5.2% for LH, 2.7 and 5.5% for FSH, and 15% for inhibin B. The detection limits were 0.15 IU/liter, 0.2 IU/liter, and 10 pg/ml for LH, FSH, and inhibin B, respectively. Plasma testosterone was measured with a commercial RIA method with a detection limit of 0.05 ng/ml (0.18 nmol/liter) and intra- and interassay CVs of 5.8 and 8.0%, respectively. Estradiol was measured by RIA as previously described (21), with a detection limit of 3.3 pg/ml (11.1 pmol/liter) and intra- and interassay CVs of 4.8 and 7.0%. Plasma cortisol was measured by RIA as previously reported (30).

Downloaded from jcem.endojournals.org at INSERM DISC DOC on February 18, 2010

TABLE 2. KS patients with a monoallelic mutation in *PROKR2* or *PROK2*

Cases	Gender	Familial cases	BMI (kg/m^2)	Sense of smell	Olfactory bulb MRI	Cryptorchidism/ microphallus	Spontaneous puberty	Mean testis volume (ml)	LH (IU/liter) basal-peak	FSH (IU/liter) basal-peak	E2 (pg/ml)	T (ng/ml)	Inhibin B (pg/ml)	Associated phenotypes	Genotype	Reference
															PROKR2	
1	M	No	22.8	Hyposmia (H)	Aplasia	No/yes	No	3.0	0.1–3.6	5.3–6.6		0.08	87	Hypodontia	R85C/+	
2	M	No	21.8	Anosmia (H)	Aplasia	No/no	No	0.6	0.1–0.1	0.2–1.2		1	22		R85C/+	
3	F	No	NA	Normosmia? (H)	NA		No		1.0–3.2	5.7–11.2	<		NA		R85C/+	
4	M	No	20.9	Anosmia (H)	Aplasia	Yes/no	No	2.0	0.4–2.6	0.4–1.7		0.8	<		R85G/+	
5#	M	Yes	17.3	Normosmia? (H)	NA	Yes/no	No	1.5	0.9–15.1	1.2–7.6		0.05	NA	Sleep disorder Bimanual synkinesia	R85H/+	
6#	M	Yes	NA	Normosmia? (H)	NA	No/no	Yes (delayed)	NA	NA–NA	NA–NA		NA	NA	Sleep disorder	R85H/+	
7*	F	Yes	24.2	Hyposmia (O)	Aplasia		No		0.3–NA	0.9–NA	5.2		NA		R85H/+	(11)
8*	F	Yes	27.1	Hyposmia (O)	Aplasia		Yes		NA–NA	NA–NA	NA		NA	High-arched palate	R85H/+	(11)
9	M	No	NA	Anosmia (O)	NA	Yes/no	No	NA	2.4–15	4.8–12		0.7	NA		R85L/+ *FGFR1*: A604T/+	
10	M	No	24.0	Hyposmia (H)	Aplasia	Yes/yes	No	1.3	0.2–0.9	1.5–1.5		0.4	<	Facial dysmorphy	R164Q/+	(11)
11	M	No	34.0	Anosmia (H)	NA	No/yes	No	2.2	0.5–1.0	1.2–2.6		0.3	NA		L173R/+	(11)
12	F	?	NA	Anosmia (O)	NA		No		0.8–NA	2.6–NA	14		NA		L173R/+	
13	M	Yes	23.8	Hyposmia (H)	Hypoplasia	No/no	No	3.5	2.0–19.8	3.5–6.1		1.1	59		L173R/+	
14	M	No	26.3	Anosmia (H)	Aplasia	No/no	No	2.5	0.1–4.2	0.9–2.2		0.4	NA		L173R/+	
15	F	Yes	NA	Anosmia (O)	NA		No		NA–NA	NA–NA	NA		NA	Ptosis High-arched palate	L173R/+	
16	M	No	NA	Anosmia (H)	NA	No/no	No	NA	0.1–NA	0.2–NA		0.4	NA	Severe depression	L173R/+	(11)
17	M	Yes	NA	Hyposmia (H)	Hypoplasia	Yes/no	No	NA	NA–NA	NA–NA		NA	NA	Brachydactyly (hands) + Polydactyly (right foot)	L173R/+	
18	M	Yes	24.6	Normosmia? (H)	Left hypoplasia	No/no	No	5.5	2.1–9.3	1.7–2.9		0.6	126		L173R/+	
19	M	No	16.6	Anosmia (H)	Normal	No/yes	No	1.2	0.1–2.0	0.3–4.0		0.2	NA		L173R/+	

(*Continued*)

TABLE 2. Continued

Cases	Gender	Familial cases	BMI (kg/m²)	Sense of smell	Olfactory bulb MRI	Cryptorchidism/ microphallus	Spontaneous puberty	Mean testis volume (ml)	LH (IU/liter) basal-peak	FSH (IU/liter) basal-peak	E2 (pg/ml)	T (ng/ml)	Inhibin B (pg/ml)	Associated phenotypes	Genotype	Reference
20	M	Yes	16.5	Anosmia (H)	Aplasia	No/no	No	2.6	0.1–0.1	0.2–4.5		0.2	NA	High-arched palate Psychomotor troubles	L173R/+	(11)
21	M	No	27.0	Hyposmia (O)	Aplasia	No/no	Yes	20	1.1–6.8	NA-NA		1.2	NA		L173R/+ *KAL1*: S396L	(11)
22	M	Yes	23.3	Hyposmia (H)	NA	No/Yes	No	NA	0.4–6.0	1.4–5.8		0.5	NA		L173R/+ *KAL1*: R423X	
23	F	No	22.8	Hyposmia (H)	NA		No		0.5–0.8	0.5–1.9	NA		15	Interventricular septum heart defect	W178S/+	(11)
24*	M	Yes	NA	Anosmia (H)	Aplasia	No/no	Yes	NA	NA–NA	NA–NA		NA	NA		Q210R/+	(11)
25*	M	Yes	NA	Anosmia (H)	NA	No/no	Yes	NA	3.5–NA	14.1–NA		3.9	NA		Q210R/+	(11)
26	M	No	NA	Anosmia (O)	Asymmetric hypoplasia	Yes/no	No	NA	0.1–0.6	0.3–2.1		0.3	NA		W251L/+	
27	M	No	28.4	Anosmia (H)	Aplasia	No/no	No	3.1	0.1–2.1	0.2–2.5		0.3	18		R268C/+	(11)
28	M	No	23.6	Anosmia (H)	Hypoplasia	No/no	Yes	25	3.0–NA	7.0–NA		2.2	NA	Nonsecretory pituitary macroadenoma	R268C/+ *KISS1R*: A189T/+	
29	M	No	22.5	Anosmia (O)	NA	No/no	No	2.5	0.1–0.1	0.2–1.2		NA	<		P290S/ +	
30	M	No	28.0	Hyposmia (H)	NA	No/no	No	1.3	0.7–10.5	0.7–2.4		0.4	NA		P290S/+	
31	M	No	28.3	Anosmia (O)	Aplasia	Yes/no	No	1.2	0.2–0.5	0.5–2.0		0.06	75	Alleged sleep disorder	P290S/+	(11)
32	M	No	20.3	Anosmia (H)	Normal	Yes/yes	No	5.0	0.3–1.3	0.2–3.4		0.3	NA		P290S/+	(11)
33	F	Yes	NA	Hyposmia (H)	NA		Partial (breast development)		4.0–NA	4.0–NA	28		NA		P290S/+	
34	M	No	26.9	Anosmia (H)	Aplasia	Yes/yes	No	6.0	0.1–10	2.5–8.0		1.8	15	Diabetes mellitus Ptosis	V331 M/+ *GNRHR*: R240Q/+ *PROK2*	(11)
35	M	Yes	26.6	Normosmia? (H)	NA	No/no	No	NA	1.0–10	1.0–3.5		0.5	NA		G32R/+	(11)
36	M	No	28.0	Anosmia (O)	Hypoplasia	No/no	No	2.0	1.5–3.0	0.8–2.0		0.2	NA		S54N/+	
37	M	No	29.6	Anosmia (H)	Hypoplasia	Yes/yes	No	2.2	0.2–1.4	0.3–1.3		0.3	NA	Horizontal nystagmus	R73C/+	
38	F	Yes	43.0	Anosmia (H)	NA		Partial (breast development)		0.3–4.9	0.9–2.9	73		NA	Sleep disorder	R73C/+	(11)

(*Continued*)

TABLE 2. Continued

Cases	Gender	Familial cases	BMI (kg/m²)	Sense of smell	Olfactory bulb MRI	Cryptorchidism/ microphallus	Spontaneous puberty	Mean testis volume (ml)	LH (IU/liter) basal-peak	FSH (IU/liter) basal-peak	E2 (pg/ml)	T (ng/ml)	Inhibin B (pg/ml)	Associated phenotypes	Genotype	Reference
39	M	Yes	NA	Anosmia (O)	NA	Yes/yes	No	NA	0.1–0.5	0.2–0.5		0.1	NA	Pectus excavatum High-arched palate Bilateral perceptive deafness	H104Y/+	
40*	F	Yes	21.9	Anosmia (O)	Aplasia	No/no	No	5.2	0.1–3.0	0.2–3.0	5	1.3	NA		G100fsX22/+	(11)
41*	M	Yes	18.9	Normosmia (O)	NA		No		0.1–9.0	0.2–3.0			NA		G100fsX22/+	(11)

Superscript symbols denote related patients. M, Male; F, female; NA, not available; H, by history; O, olfactometry; E2, estradiol; T, testosterone; <, below detection limit (see *Patients and Methods*).

Statistical analyses

Quantitative results are reported as individual values in the figures and tables, and as means ± SD in the text. Hormonal parameters, testicular volume and body mass index (BMI) were compared using the Mann-Whitney, Wilcoxon, or Kolmogorov-Smirnov nonparametric tests. Qualitative variables were compared using the χ^2 test. $P \leq 0.05$ were considered to denote significant differences.

Results

The phenotypic features of the patients carrying monoallelic and biallelic mutations in *PROKR2* or *PROK2* are presented in Tables 2 and 3, respectively. Pedigrees of the new familial cases are shown in Fig. 1.

Reproductive phenotype in men

Five of 32 male patients with monoallelic mutations (16%) had undergone spontaneous puberty *vs.* none in the 10 patients with biallelic mutations. The difference between the two groups was, however, not statistically significant ($P = 0.18$).

Prevalence of microphallus and cryptorchidism

Nine of the 10 male patients with biallelic mutations (90%) and nine of the 32 male patients with monoallelic mutations (28%) had microphallus at diagnosis ($P < 0.001$). Cryptorchidism was also more frequent in patients with biallelic mutations than patients with monoallelic mutations (70 *vs.* 34%; $P < 0.05$). Notably, all the male patients with biallelic mutations had either microphallus or cryptorchidism (four patients) or both (six patients).

Testicular volume and testosterone secretion

Mean testicular volume was lower in the patients with biallelic mutations (1.2 ± 0.4 ml) than the patients with monoallelic mutations (4.5 ± 6.0 ml; $P < 0.01$) (Fig. 2A). Circulating testosterone levels were always below normal and were on average lower in patients with biallelic mutations (0.2 ± 0.1 *vs.* 0.7 ± 0.8 ng/ml; $P = 0.05$) (Fig. 2B).

Basal and stimulated gonadotropin levels

The mean basal FSH level was lower in patients with biallelic mutations than patients with monoallelic mutations (0.3 ± 0.1 *vs.* 1.8 ± 3.0 IU/liter; $P < 0.05$) and was below normal in both groups of patients (Fig. 2C). The mean poststimulation LH peak level was also lower in patients with biallelic mutations (0.8 ± 0.8 *vs.* 5.2 ± 5.5 IU/liter; $P < 0.05$) (Fig. 2D). In contrast, the mean basal LH levels (0.3 ± 0.4 *vs.* 0.7 ± 1.0 IU/liter; $P = 0.57$) and poststimulation FSH levels (3.3 ± 1.6 *vs.* 3.6 ± 2.7 IU/liter; $P = 0.60$) were not significantly different between these two groups.

TABLE 3. KS patients with biallelic mutations in *PROKR2* or *PROK2*

Cases	Gender	Familial cases	BMI (kg/m²)	Sense of smell	Olfactory bulb MRI	Cryptorchidism/ microphallus	Spontaneous puberty	Testis volume (ml)	LH (IU/liter) basal-peak	FSH (IU/liter) basal-peak	E2 (pg/ml)	T (ng/ml)	Inhibin B (pg/ml)	Associated phenotypes	Genotype	Reference
															PROKR2	
42	M	No	19.6	Hyposmia (H)	Hypoplasia	Yes/yes	No	0.9	0.3–2.4	0.5–4.1		0.08	<		R85C/R85C	
43	F	No	28.0	Anosmia (H)	NA		No		NA–NA	NA–NA	NA		NA		R85H/R85H	(11)
44	F	No	24.2	Anosmia (H)	NA		No		0.5–2.7	0.3–1.9	<		NA		R164Q/T330fsX5	
45	M	No	24.5	Anosmia (H)	Aplasia	Yes/yes	No	0.6	0.6–1.2	0.3–0.5		0.1	11		L173R/L173R	(11)
46	M	No	30.3	Hyposmia (H)	Aplasia	Yes/yes	No	0.7	0.2–1.0	0.4–5.0		0.4	NA		L173R/L173R	
47[c]	M	Yes	21.7	Anosmia (H)	NA	No/yes	No	1.5	0.1–0.1	0.2–2.6		0.3	NA		Q210R/L173R	(11)
48[c]	M	Yes	26.8	Anosmia (H)	NA	No/yes	No	1.2	0.1–0.1	0.2–3.5		0.2	NA		Q210R/L173R	(11)
49[c]	M	Yes	26.2	Anosmia (H)	NA	Yes/yes	No	1.5	0.1–0.1	0.2–2.9		0.3	NA		Q210R/L173R	(11)
50	F	No	24.3	Anosmia (O)	Hypoplasia		No		0.1–0.5	0.2–1.5	NA		NA		P290S/P290S	
51	F	No	21.2	Anosmia (O)	Aplasia		No		0.1–2.2	0.6–4.0	<		NA		P290S/P290S	
52[a]	M	Yes	21.7	Hyposmia (H)	Aplasia	Yes/yes	No	2.0	0.5–0.5	0.3–5.0		0.4	NA		M323I/H420fsX24	(11)
53[a]	M	Yes	21.7	Anosmia (H)	NA	Yes/yes	No	1.5	NA–NA	NA–NA		0.3	NA		M323I/H420fsX24	(11)
															PROK2	
54	M	No	NA	Anosmia (H)	Aplasia	Yes/no	No	1	1.2–NA	0.3–NA		0.3	NA		I55fsX1/I55fsX1	(15)
55	M	No	18.1	Anosmia (H)	Aplasia	No/yes	No	1.2	0.1–NA	0.2–NA		0.1	NA		R73C/R73C	(15)

Superscript symbols denote related patients. Note that patients 24 and 25 (Table 2) and 47, 48, and 49 (Table 3) are from the same family. M, Male; F, female; NA, not available; H, by history; O, olfactometry; E2, estradiol; T, testosterone; <, below detection limit (see *Patients and Methods*).

Reproductive phenotype in women

The four women with biallelic *PROKR2* mutations all had primary amenorrhea and no spontaneous breast development. Their gonadotropin and estradiol levels were low. Eight of nine women with monoallelic mutations in *PROKR2* or *PROK2* had primary amenorrhea. Six had no breast development at diagnosis before any estrogen replacement therapy, whereas two had near-normal spontaneous breast development (Tanner stage IV). Their plasma estradiol levels were low or reached values observed in normal women in follicular phase. Finally, one woman had anosmia without hypogonadism.

Olfactory phenotype

All 14 patients with biallelic mutations in *PROKR2* or *PROK2* had an abnormal sense of smell, either anosmia (11 patients) or hyposmia (three patients), whereas six of 41 patients with monoallelic mutations in either gene (15%) had a seemingly normal sense of smell, as assessed by history and confirmed by olfactometry in one patient. The difference between the two groups was, however, statistically nonsignificant ($P = 0.13$).

Other clinical anomalies

Nonreproductive, nonolfactory clinical anomalies were rare. Twenty-nine patients (21 with monoallelic and eight with biallelic mutations) underwent kidney ultrasonography, and all had normal findings. Four patients had high-arched palate, one patient had hypodontia (one missing molar), and two patients had a ptosis. Four patients reported sleep disorders, one of whom (patient 31) complained of recurrent sleep onset insomnia. During nighttime and daytime sleep monitoring, however, his sleep quality and duration were normal (supplemental table, published as supplemental data on The Endocrine Society's Journals Online web site at http://jcem.endojournals.org). One patient had bimanual synkinesia, one had audiometrically documented hearing loss, one had horizontal nystagmus, one had facial dysmorphism (hypertelorism, epicanthus, flat nose), and one had brachydactyly of the hands and postaxial type B polydactyly of the right foot. Finally, an interventricular septum heart defect, severe depression, psychomotor difficulties, and diabetes mellitus were each found in a patient with a monoallelic *PROKR2* mutation. None of the patients had cleft lip/palate.

BMI

Because obesity has been reported in some KS patients with *PROK2* or *PROKR2* mutations (11, 13), we compared BMI values in nine male KS patients with biallelic mutations, 24 male patients with monoallelic mutations,

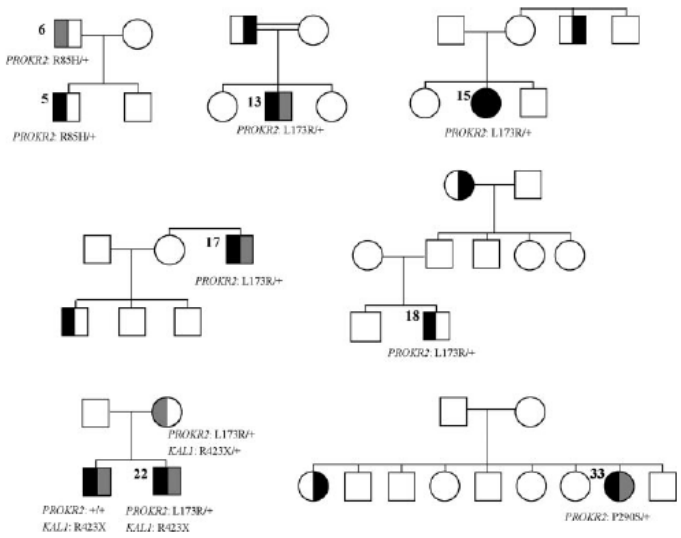


FIG. 1. Pedigrees of the new familial cases. *Filled symbols* denote individuals affected by KS (both hypogonadism and anosmia or hyposmia). *Right half-filled symbols* denote individuals with hyposmia (*gray*) or anosmia (*black*). *Left half-filled symbols* denote individuals with delayed puberty (*gray*) or hypogonadism (*black*). The patients' numbers are indicated. Notably, patient 22 (*PROKR2*: L173R/+; *KAL1*: R423X) has the same clinical status as his affected brother who does not harbor the *PROKR2* mutation. Therefore, the nonsense mutation in the X chromosome-linked *KAL1* gene is probably sufficient to account for the KS in these male patients. This mutation is, however, unlikely to account for the mother's delayed puberty, which may rather result from synergistic effects of the *KAL1* and *PROKR2* monoallelic mutations.

and 39 age- and treatment-matched male KS patients without detected mutations in *PROK2* or *PROKR2*. These controls include 14 patients with mutations in *KAL1* (eight patients) or *FGFR1* (six patients). We also compared BMI values between the nine female patients with monoallelic or biallelic mutations in *PROK2* or *PROKR2* and nine age- and treatment-matched female KS patients without detected mutations in these genes, including four patients with *FGFR1* mutations. Three patients, comprising a man with a biallelic *PROKR2* mutation, a man with a monoallelic *PROKR2* mutation and a woman with a monoallelic *PROK2* mutation were obese (BMI > 30 kg/m^2), but on the whole the mean BMI values in the male and female patients carrying *PROK2* or *PROKR2* mutations were not different from those in the control KS patients of the same gender (23.9 ± 4.2 *vs.* 23.8 ± 5.2 kg/m^2, $P = 0.43$, and 26.3 ± 6.6 *vs.* 25.4 ± 3.8 kg/m^2, $P = 0.50$, for males and females, respectively). Moreover, no significant differences were found between the male patients carrying biallelic mutations (23.4 ± 3.8 kg/m^2) and those carrying monoallelic mutations (24.1 ± 4.4 kg/m^2) or those who did not carry mutations in *PROK2* or *PROKR2* ($P = 0.50$ and $P = 0.55$, respectively) (Fig. 3).

Circadian cortisol pattern

Because reduced rhythmicity of circulating glucocorticoid levels has been reported in Prok2-null mutant mice (31), we examined circadian plasma cortisol levels in five patients with mutations in *PROKR2* or *PROK2*, including one patient with biallelic mutations in *PROKR2*. As shown in Fig. 4, the circadian pattern was normal in all five patients, including a normal nadir at midnight.

Discussion

One aim of this study was to compare, in a significant number of KS patients, the reproductive and olfactory phenotypes of subjects harboring biallelic *vs.* monoallelic mutations in *PROK2* or *PROKR2*. We found that male patients harboring biallelic mutations have a more severe reproductive phenotype, with higher prevalence of both microphallus and cryptorchism, and a lower mean testicular volume, associated with lower basal FSH and stimulated LH levels. In females, no meaningful statistical comparisons could be made, owing to the small number of female patients with biallelic mutations, but the more severe reproductive phenotype (primary amenorrhea and no breast development) was found in these four women. Therefore, in our cohort, both male and female patients carrying biallelic mutations in *PROKR2* or *PROK2* had uniformly severe reproductive phenotypes before hormone replacement therapy, an observation reinforced by the seven additional patients homozygous for *PROKR2* or *PROK2* mutations (six males and one female) who have been reported so far (12, 13, 16). By contrast, the reproductive phenotype of patients harboring monoallelic mutations in PROK2 or PROKR2 was more variable, in agreement with our prediction. These results suggest that a presumably deep impairment in prokineticin signaling through prokineticin receptor 2 due to biallelic mutations either in *PROKR2* or *PROK2* often results in a more severe reproductive phenotype than a mild dysfunction in this pathway due to *PROKR2* or *PROK2* monoallelic mutations, even though this dysfunction is likely to be combined with an impairment in another putative pathway not yet discovered, within the framework of a digenic/oligogenic mode of inheritance of the disease.

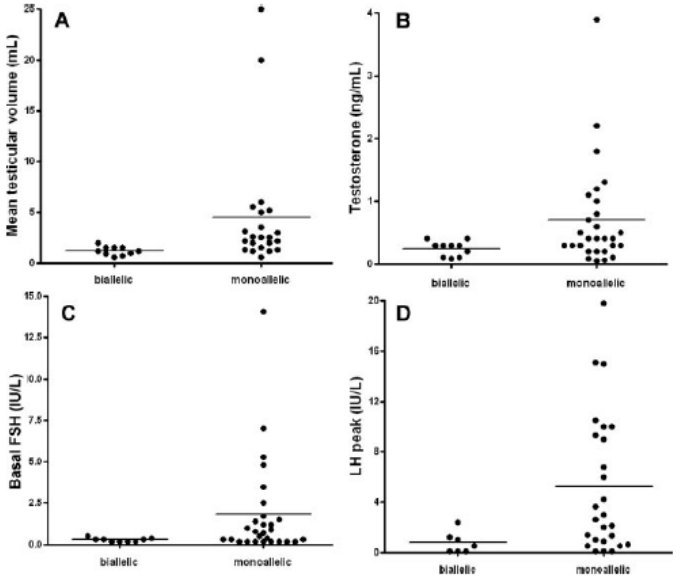


FIG. 2. Individual values of mean testicular volume (A), plasma total testosterone (B), basal serum FSH (C), and the LH response (peak) to GnRH (D) in male patients with biallelic and monoallelic mutations in *PROKR2* or *PROK2*. The normal ranges in men are 15–30 ml for testicular volume, 2.9–8.3 ng/ml for testosterone, 3.0–7.0 IU/liter for basal FSH, and 6.0–23 IU/liter for stimulated LH. A significant difference between patients with biallelic and monoallelic mutations is observed in testicular volume ($P < 0.01$), testosterone ($P = 0.05$), basal FSH ($P < 0.05$), and LH peak ($P < 0.05$).

In keeping with other descriptions of KS patients harboring mutations in *PROKR2* or *PROK2*, anosmia or hyposmia was observed in all the patients with biallelic mutations studied here, whereas this cardinal KS sign was apparently absent (by history) in 15% of the patients with monoallelic mutations. Only one woman with biallelic mutations in *PROK2* has been reported to have isolated congenital HH (12), but the existence of hyposmia in this patient cannot be ruled out in the absence of olfactometry.

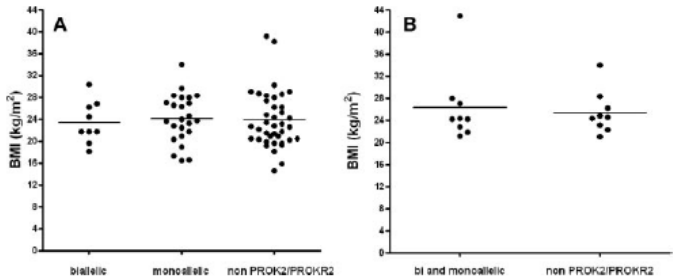


FIG. 3. Individual BMI values in male and female patients. A, From left to right, male KS patients with biallelic and monoallelic *PROKR2* or *PROK2* mutations and without mutations in these genes. No significant differences between the groups are observed. B, From left to right, female KS patients with mutations in *PROKR2* or *PROK2* (monoallelic or biallelic) and without mutations in these genes. No significant difference between the two groups is observed.

Another aim of this study was to identify associated nonreproductive, nonolfactory manifestations in these KS patients harboring mutations in *PROKR2* or *PROK2*. In keeping with previous reports (11–16), additional clinical anomalies frequently reported together with *KAL1* and *FGFR1* mutations were rare in our series of patients. Indeed, no cases of renal agenesis or cleft lip/palate were seen, and there was only one case each of bimanual synkinesia, hearing loss, and hypodontia (1). Moreover, some additional disorders that were observed in only one patient each may represent fortuitous associations, including diabetes mellitus, psychomotor troubles, and depression. These data are reassuring for candidates for medically assisted reproduction because they show the rarity of additional disorders potentially affecting their offspring's health (*e.g.* renal agenesis) or quality of life (cleft lip or palate, hearing loss, bimanual synkinesia).

Obesity has been tentatively linked to *PROK2* and *PROKR2* mutations on the basis of a few reported human cases (11, 13) and the known involvement of this signaling pathway in rodent eating behavior (31). We therefore compared BMI values in patients carrying monoallelic and biallelic mutations in *PROK2* or *PROKR2* and in KS patients without mutations in these genes. The mean BMI values were not significantly different, thus challenging the hypothetical link between obesity and *PROK2/PROKR2* mutations.

Prok2-null mice display significantly reduced rhythmicity in a variety of physiological parameters, including the sleep-wake cycle and circulating glucocorticoid levels (31, 32). Four of the 55 patients complained of sleep disorders. However, sleep was analyzed in one of these individuals and had a normal structure. Therefore, a causal relationship between *PROK2* or *PROKR2* mutations and sleep disorders remains to be established in humans. We also measured plasma cortisol levels at 4-h intervals for 24 h in five of the *PROK2/PROKR2*-mutated patients (including a patient with biallelic mutations in

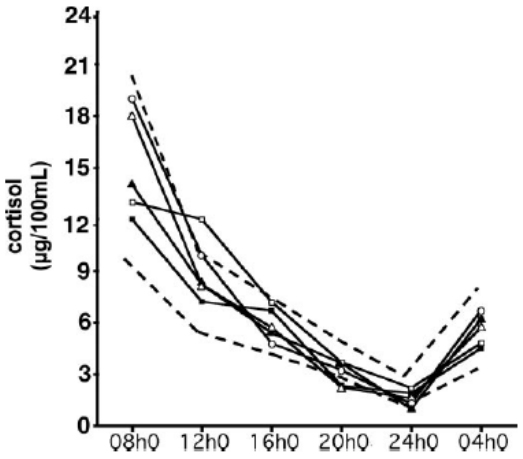


FIG. 4. Individual circadian plasma cortisol levels in five patients. Patients 5 (*white triangles*), 30 (*white squares*), 31 (*white circles*), 38 (*black squares*), and 45 (*black triangles*) were studied. The normal range in 12 adults is indicated by the *dotted lines*.

PROKR2 and three patients claiming to have sleep disorders) and observed a normal circadian rhythm in all patients. These results, which do not exclude more subtle defects not discernible by 4-h cortisol measurements, argue against a major contribution of the PROKR2 receptor signaling to physiological circadian cortisol variations in humans.

In conclusion, KS patients harboring biallelic mutations in *PROK2* or *PROKR2* have a more severe reproductive phenotype than patients with monoallelic mutations in these genes. Associated disorders are infrequent and were not observed in patients with biallelic mutations. Finally, we conclude from our series of patients that mutations in these genes do not appear to be associated with obesity or with a clear abnormal circadian glucocorticoid pattern.

Acknowledgments

We thank Chrystel Leroy, Corinne Fouveaut, Isabelle Boucly, and Carine Cogliatti for technical assistance in gene sequencing.

Address all correspondence and requests for reprints to: Professor Jacques Young, Service d'Endocrinologie, Hôpital Bicêtre, 78 Rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France. E-mail: jacques.young@bct.aphp.fr.

This work was supported by grants from Université Paris Sud 11 (BQR 2009) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-05-MRAR-027-01). J.S. was supported by a fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale.

Disclosure Summary: The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Dodé C, Hardelin JP 2009 Kallmann syndrome. Eur J Hum Genet 17:139–146
2. Naftolin F, Harris GW, Bobrow M 1971 Effect of purified luteinizing hormone releasing factor on normal and hypogonadotropic anosmic men. Nature 232:496–497
3. Schwanzel-Fukuda M, Bick D, Pfaff DW 1989 Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. Mol Brain Res 6:311–326
4. Franco B, Guioli S, Pragliola A, Incerti B, Bardoni B, Tonlorenzi R, Carrozzo R, Maestrini E, Pieretti M, Taillon-Miller P, Brown CJ, Willard HF, Lawrence C, Persico MG, Camerino G, Ballabio A 1991 A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. Nature 353:529–536
5. Legouis R, Hardelin J-P, Levilliers J, Claverie JM, Compain S, Wunderle V, Millasseau P, Le Paslier D, Cohen D, Caterina D, Bougueleret L, Delemarre-Van de Waal H, Lutfalla G, Weissenbach J, Petit C 1991 The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. Cell 67:423–435
6. Hardelin JP, Levilliers J, del Castillo I, Cohen-Salmon M, Legouis R, Blanchard S, Compain S, Bouloux P, Kirk J, Moraine C, Chaussain J-L, Weissenbach J, Petit C 1992 X chromosome-linked Kallmann syndrome: stop mutations validate the candidate gene. Proc Natl Acad Sci USA 89:8190–8194
7. Dodé C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Dû N, Soussi-Yanicostas N, Coimbra RS, Delmaghani S, Compain-Nouaille S, Baverel F, Pecheux C, Le Tessier D, Cruaud C, Delpech M, Speleman F, Vermeulen S, Amalfitano A, Bachelot Y, Bouchard P, Cabrol S, Carel JC, Delemarre-van de Waal H, Goulet-Salmon B, Kottler ML, Richard O, Sanchez-Franco F, Saura R, Young J, Petit C, Hardelin JP 2003 Loss-of-function mutations in *FGFR1* cause autosomal dominant Kallmann syndrome. Nat Genet 33:463–465
8. Falardeau J, Chung WC, Beenken A, Raivio T, Plummer L, Sidis Y, Jacobson-Dickman EE, Eliseenkova AV, Ma J, Dwyer A, Quinton R, Na S, Hall JE, Huot C, Alois N, Pearce SH, Cole LW, Hughes V, Mohammadi M, Tsai P, Pitteloud N 2008 Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. J Clin Invest 118:2822–2831
9. Kim HG, Kurth I, Lan F, Meliciani I, Wenzel W, Eom SH, Kang GB, Rosenberger G, Tekin M, Ozata M, Bick DP, Sherins RJ, Walker SL, Shi Y, Gusella JF, Layman LC 2008 Mutations in *CHD7*, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. Am J Hum Genet 83:511–519
10. Jongmans MC, van Ravenswaaij-Arts CM, Pitteloud N, Ogata T, Sato N, Claahsen-van der Grinten HL, van der Donk K, Seminara S, Bergman JE, Brunner HG, Crowley Jr WF, Hoefsloot LH 2009 CHD7 mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome—the clinical overlap with CHARGE syndrome. Clin Genet 75:65–71
11. Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler ML, Lespinasse J, Lienhardt-Roussie A, Mathieu M, Moerman M, Morgan G, Murat A, Toublanc JE, Wolczynski S, Delpech M, Petit C, Young J, Hardelin JP 2006 Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. PLoS Genet 2:1648–1652
12. Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW, Plummer L, Jacobson-Dickman EE, Mellon PL, Zhou QY, Crowley Jr WF 2007 Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. Proc Natl Acad Sci USA 104:17447–17452
13. Abreu AP, Trarbach EB, de Castro M, Frade Costa EM, Versiani B, Matias Baptista MT, Garmes HM, Mendonca BB, Latronico AC 2008 Loss-of-function mutations in the genes encoding prokineti-

cin-2 or prokineticin receptor-2 cause autosomal recessive Kallmann syndrome. J Clin Endocrinol Metab 93:4113–4118
14. Cole LW, Sidis Y, Zhang C, Quinton R, Plummer L, Pignatelli D, Hughes VA, Dwyer AA, Raivio T, Hayes FJ, Seminara SB, Huot C, Alos N, Speiser P, Takeshita A, Van Vliet G, Pearce S, Crowley Jr WF, Zhou QY, Pitteloud N 2008 Mutations in prokineticin 2 (PROK2) and PROK2 receptor 2 (PROKR2) in human gonadotrophin-releasing hormone deficiency: molecular genetics and clinical spectrum. J Clin Endocrinol Metab 93:3551–3559
15. Leroy C, Fouveaut C, Leclercq S, Jacquemont S, Boullay HD, Lespinasse J, Delpech M, Dupont JM, Hardelin JP, Dodé C 2008 Biallelic mutations in the prokineticin-2 gene in two sporadic cases of Kallmann syndrome. Eur J Hum Genet 16:865–868
16. Sinisi AA, Asci R, Bellastella G, Maione L, Esposito D, Elefante A, De Bellis A, Bellastella A, Iolascon A 2008 Homozygous mutation in the prokineticin-receptor2 gene (Val274Asp) presenting as reversible Kallmann syndrome and persistent oligozoospermia: case report. Hum Reprod 23:2380–2384
17. Monnier C, Dodé C, Fabre L, Teixeira L, Labesse G, Pin JP, Hardelin JP, Rondard P 2009 PROKR2 missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling-activity. Hum Mol Genet 18:75–81
18. Matsumoto S, Yamazaki C, Masumoto KH, Nagano M, Naito M, Soga T, Hiyama H, Matsumoto M, Takasaki J, Kamohara M, Matsuo A, Ishii H, Kobori M, Katoh M, Matsushime H, Furuichi K, Shigeyoshi Y 2006 Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. Proc Natl Acad Sci USA 103:4140–4145
19. Chan YM, de Guillebon A, Lang-Muritano M, Plummer L, Cerrato F, Tsiaras S, Gaspert A, Lavoie HB, Wu CH, Crowley Jr WF, Amory JK, Pitteloud N, Seminara SB 2009GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. Proc Natl Acad Sci USA 106:11703–11708
20. Hardelin JP, Levilliers J, Blanchard S, Carel JC, Leutenegger M, Pinard-Bertelletto JP, Bouloux P, Petit C 1993 Heterogeneity in the mutations responsible for X chromosome-linked Kallmann syndrome. Hum Mol Genet 2:373–377
21. Bouligand J, Ghervan C, Tello JA, Brailly-Tabard S, Salenave S, Chanson P, Lombès M, Millar RP, Guiochon-Mantel A, Young J 2009 Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a *GNRH1* mutation. N Engl J Med 360:2742–2748
22. de Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, Chanson P, Schaison G, Milgrom E 1997 A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. N Engl J Med 337:1597–1602
23. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E 2003 Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proc Natl Acad Sci USA 100:10972–10976
24. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JR, Ozbek MN, Imamoglu S, Akalin NS, Yuksel B, O'Rahilly S, Semple RK 2009 TAC3 and *TACR3* mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for neurokinin B in the central control of reproduction. Nat Genet 41:354–358
25. Bin-Abbas B, Conte FA, Grumbach MM, Kaplan SL 1999 Congenital hypogonadotropic hypogonadism and micropenis: effect of testosterone treatment on adult penile size why sex reversal is not indicated. J Pediatr 134:579–583
26. Salenave S, Chanson P, Bry H, Pugeat M, Cabrol S, Carel JC, Murat A, Lecomte P, Brailly S, Hardelin JP, Dodé C, Young J 2008 Kallmann's syndrome: a comparison of the reproductive phenotypes in men carrying *KAL1* and *FGFR1/KAL2* mutations. J Clin Endocrinol Metab 93:758–763
27. Eloit C, Trotier D 1994 A new clinical olfactory test to quantify olfactory deficiencies. Rhinology 32:57–61
28. Vernet C, Arnulf I 2009 Idiopathic hypersomnia with and without long sleep time: a controlled series of 75 patients. Sleep 32:753–759
29. Robertson D, Burger HG, Sullivan J, Cahir N, Groome N, Poncelet E, Franchimont P, Woodruff T, Mather JP 1996 Biological and immunological characterization of inhibin forms in human plasma. J Clin Endocrinol Metab 81:669–676
30. Salenave S, Gatta B, Pecheur S, San-Galli F, Visot A, Lasjaunias P, Roger P, Berge J, Young J, Tabarin A, Chanson P 2004 Pituitary magnetic resonance imaging findings do not influence surgical outcome in adrenocorticotropin-secreting microadenomas. J Clin Endocrinol Metab 89:3371–3376
31. Li JD, Hu WP, Boehmer L, Cheng MY, Lee AG, Jilek A, Siegel JM, Zhou QY 2006 Attenuated circadian rhythms in mice lacking the prokineticin 2 gene. J Neurosci 26:11615–11623
32. Hu WP, Li JD, Zhang C, Boehmer L, Siegel JM, Zhou QY 2007 Altered circadian and homeostatic sleep regulation in prokineticin 2-deficient mice. Sleep 30:247–256
33. Cerrato F, Shagoury J, Kralickova M, Dwyer A, Falardeau J, Ozata M, Van Vliet G, Bouloux P, Hall JE, Hayes FJ, Pitteloud N, Martin KA, Welt C, Seminara SB 2006 Coding sequence analysis of *GNRHR* and *GPR54* in patients with congenital and adult-onset forms of hypogonadotropic hypogonadism. Eur J Endocrinol 155(Suppl 1):S3–S10

II Etude rythme et sommeil chez les patients KS porteurs de mutations *PROK2* ou *PROKR2.*

La voie de signalisation PROKR2 via PROK2 est impliquée dans le contrôle des rythmes circadiens (cf. Introduction chapitre III.2.3). Il nous paraissait donc intéressant d'évaluer les rythmes circadiens de nos patients mutés *PROK2* ou *PROKR2*. Le rythme circadien le plus accessible chez l'homme est celui du cortisol dont on connait les normes et dont le dosage est accessible en pratique quotidienne. Ainsi, notre première approche du rythme circadien de patients mutés fut celle d'une mesure du cycle du cortisol chez 5 patients mutés *PROK2* ou *PROKR2 via* une mesure du cortisol toutes les 4 heures au cours d'un cycle de 24 heures. On avait pu observer la persistance d'un rythme circadien de sécrétion de cortisol chez ces patients (cf. Résultats Chapitre 1, I. et Article I).

Chez l'homme le rythme circadien de la température centrale (difficilement accessible) influence la rapidité d'endormissement et la durée des épisodes de sommeil. Quatre patients de notre cohorte (cf. Article I) se plaignaient de troubles du sommeil (*PROKR2* R85H/+, R85H/+, P290S/+ et *PROK2* R73C/+). Nous avons donc voulu évaluer de façon plus précise le sommeil de nos patients en collaboration avec le Dr Isabelle Arnulf, responsable de l'unité des pathologies du sommeil à l'Hôpital Pitié-Salpétrière. Nous avons également évalué leur rythme d'activité circadienne. Nous avons comparé des patients KS porteurs de mutations *PROK2* ou *PROKR2* à des patients KS non mutés (cf. Patients et Méthodes, chapitre I.1).

II.1 Résultats

Les résultats sont présentés sous la forme de 2 tableaux, pour les résultats du questionnaire de rythme Horne et Ostberg (Tableau 12) d'une part et pour les résultats du questionnaire de Pittsburgh relatif à la qualité du sommeil d'autre part (Tableau 13).

	Patients KS mutés *PROK2* ou *PROKR2*	Témoins	Patients KS non mutés	p
Nombre	13	34	23	
% masculin	69.3	55.9	56.5	0.5/0.5
Age en années, moyenne±DS	32.5±12.6	42.6±17.2	32.9±12.4	0.2/0.1
(min-max)	(16-53)	(18-71)	(18-62)	
Score total	48.8±13.5	56.2±8.8	56.5±8.6	0.2/0.2
(min-max)	(30-72)	(38-73)	(39-73)	
Chronotype du matin, n (%)	3/13 (23)	15/34 (44.1)	10/23(43.5)	0.3/0.3
Chronotype neutre, n (%)	6/13 (46.1)	17/34 (50)	12/23(52.2)	1/1
Chronotype du soir, n (%)	4/13 (30.8)	2/34 (5.9)	1/23(4.3)	0.04/0.04*

Tableau 12: Comparaison des résultats au questionnaire de rythme de Horne et Ostberg des groupes KS mutés *PROK2* ou *PROKR2*, témoins et KS non mutés. p, utilisation des tests de Fisher pour les variables qualitatives et Wilcoxon pour les variables quantitatives. La première valeur compare le groupe KS mutés au groupe témoin et la 2ème valeur compare le groupe KS mutés au groupe KS non mutés.* correspond à une différence significative entre les 2 groupes.

	Patients KS mutés *PROK2* ou *PROKR2*	Témoins	Patients KS non mutés	p
Nombre	13	10	23	
% masculin	69.3	50	56.5	0.4/0.5
Age, en années, moyenne±DS	32.5±12.6	53.4±10.1	32.9±12.4	0.005*/0.1
(min-max)	(16-53)	(18-71)	(18-62)	
1- Qualité subjective du sommeil	1.5±0.9 (0-3)	0.4±0.7 (0-2)	1.05±0.7 (0-2)	0.01*/0.3
2- Latence du sommeil	1.5±1.2 (0-3)	0±0 (0-0)	1.1±1.0 (0-3)	0.02*/0.5
3- Durée du sommeil	0.7±0.8 (0-3)	0.5±0.5 (0-2)	0.7±0.8 (0-3)	0.6/0.9
4- Efficacité habituelle du sommeil	0.6±0.8 (0-2)	0.2+0.4 (0-1)	0.4±0.9 (0-3)	0.2/0.8
5- Troubles du sommeil	1.3±0.7 (0-3)	1.0±0.5 (0-2)	1.2±0.7 (0-3)	0.3/0.7
6- Utilisation de somnifères	0.08±0.3 (0-1)	0.1±0.3 (0-1)	0.3±0.9 (0-3)	1.0/0.5
7- Fonction diurne	0.8±0.8 (0-2)	0.2±0.4 (0-1)	0.8±0.8 (0-3)	0.09/1.0

Tableau 13 : Comparaison des résultats au questionnaire de sommeil de Pittsburgh des groupes KS mutés *PROK2* ou *PROKR2*, témoins et KS non mutés. p, utilisation des tests de Fisher pour les variables qualitatives et Wilcoxon pour les variables quantitatives. La première valeur compare le groupe KS mutés au groupe témoin et la 2ème valeur compare le groupe KS mutés au groupe KS non mutés.

En ce qui concerne l'évaluation du rythme circadien, les résultats recueillis grâce au questionnaire de Horne et Ostberg mettent en évidence une augmentation significative de la proportion de patients ayant un chronotype du soir chez les patients KS mutés *PROK2* ou *PROKR2* en comparaison du groupe témoin (30.8% vs 5.9%) et des patients KS non mutés (30.8% vs 4.3%). Cette comparaison est d'autant plus significative que le groupe de patients KS mutés *PROK2* ou *PROKR2* et ces 2 groupes témoins n'ont pas de différence significative d'âge. En revanche, l'évaluation du sommeil ne met en évidence des différences significatives qu'entre le groupe de patients KS mutés *PROK2* ou *PROKR2* et le groupe témoin. En effet, la qualité subjective du sommeil est significativement vécue comme plus mauvaise dans le groupe de patients KS mutés *PROK2* ou *PROKR2* et la latence de sommeil de ce groupe est plus longue que dans le groupe témoin. Mais, ce groupe de témoins, qui est différent du groupe témoin utilisé pour l'évaluation du rythme, est significativement plus âgé que le groupe de patients KS mutés *PROK2* ou *PROKR2.* La comparaison entre le groupe KS mutés *PROK2* ou *PROKR2* et le groupe KS non mutés *PROK2* ou *PROKR2* ne met pas en évidence de différence, ces 2 groupes ont des âges qui sont, cette fois-ci, non significativement différents. Ainsi, il semblerait que les différences constatées entre le groupe de patients KS mutés *PROK2* ou *PROKR2* et le groupe témoin soient des différences liées à l'âge significativement plus élevé des témoins. Nous sommes actuellement en cours de constitution d'un groupe témoin pour l'évaluation du sommeil dont l'âge n'est pas différent du groupe KS.

En conclusion, de même que chez la souris *Prokr2-/-* (cf. Introduction chapitre III.2.3), il semble apparaitre chez nos patients mutés *PROK2* ou *PROKR2* une redistribution temporelle de l'activité avec une période active de la journée qui, lorsqu'elle est choisie volontairement, est plus tardive. La qualité du sommeil ne semble pas, à ce niveau d'exploration, touché par le défaut de signalisation PROK2 via PROKR2. Ces résultats préliminaires ont motivé la mise en place d'un protocole dans le service du Dr Arnulf où il est proposé à nos patients mutés *PROK2* ou *PROKR2* une exploration plus précise de leur rythme circadien par une actimétrie et une mesure interne d'au moins 48h de la température corporelle.

III Etude de la prévalence des mutations PROKR2 au sein des patients KS originaires du Maghreb.

Cette troisième partie porte sur l'étude de la prévalence des mutations *PROK2* ou *PROKR2* dans 2 populations différentes, une population de patients dits caucasiens (majoritairement européens) et une population de patients originaires du Maghreb. Au cours de la recherche de mutations de *PROK2* ou *PROKR2* dans notre cohorte de patients ayant un KS, nous avons noté, de façon inattendue, une forte prévalence de mutations *PROKR2* au sein d'un sous groupe de patients en provenance du Maghreb.

III.1 Résultats

Nous avons étudié une série de 95 patients Kallmann originaires du Maghreb (Maroc, Algérie et Tunisie) et nous avons comparé ces résultats à ceux obtenus au sein de notre série de 697 patients KS caucasiens. Nous avons trouvé des mutations de *PROKR2* chez 25/95 patients de la série Maghreb soit 26.3% alors que la prévalence était de 4.3% (30/697) dans la population caucasienne ($p<0.001$ au Fisher exact test). A l'inverse, la prévalence des mutations dans les autres gènes KS dont *PROK2* n'était pas différente. De plus, les mutations de *PROKR2* étaient différentes dans les 2 groupes. Dans la série caucasienne, la mutation principale est p.L173R qui est présente dans 37.8% des allèles mutés alors que dans la série du Maghreb, 3 mutations sont majoritairement représentées, p.P290S, p.R268C, p.R85C dans 31.2%, 25% et 21.9% des allèles mutés respectivement.

Article II

High prevalence of *PROKR2* mutations among Kallmann syndrome patients from Maghreb.

Julie Sarfati 1, Corinne Fouveaut 2, Chrystel Leroy 2, Jean-Pierre Hardelin 3, Catherine Dodé 1,2

High prevalence of *PROKR2* mutations among Kallmann syndrome patients from Maghreb

Julie Sarfati [1], Corinne Fouveaut [2], Chrystel Leroy [2], Jean-Pierre Hardelin [3], Catherine Dodé [1,2]

[1] Institut Cochin, Département de génétique et développement, Inserm U1016, Université Paris-Descartes, Paris, France

[2] Hôpital Cochin, Laboratoire de biochimie et génétique moléculaire, APHP, Paris, France

[3] Institut Pasteur, Département de neuroscience, Inserm UMRS587, Paris, France

Keywords : Kallmann syndrome, PROKR2, selection pressure

Correspondence : Catherine Dodé
Institut Cochin, Département de génétique et développement, 24 rue du faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France
Tel : +(33) 1 58 41 16 12
Fax : +(33) 1 58 41 15 80
E-Mail : catherine.dode@inserm.fr

Abstract

Kallmann syndrome (KS) is a developmental disorder, which combines hypogonadotropic hypogonadism and anosmia. Mutations in *PROKR2* and *PROK2*, encoding prokineticin receptor-2 and prokineticin-2, respectively, have been involved in some KS patients, both in heterozygous and homozygous or compound heterozygous states. We studied a cohort of 95 unrelated KS patients from Maghrebian countries, specifically, Morocco, Algeria, and Tunisia. Mutations in *PROKR2* were present in 25 patients (26.3%), compared to 4.3% in a cohort of 697 European patients, whereas mutations in other KS genes, specifically, *PROK2*, *FGFR1*, *FGF8*, and *KAL1*, were present at similar or lower frequencies in the Maghrebian versus European patients. The higher prevalence of *PROKR2* mutations in Maghrebian patients could not be explained by consanguineous marriages, since the proportion of Maghrebian patients carrying *PROKR2* mutations in heterozygous state (18.9%) was still much higher than that of European patients (3.3%), which strongly suggests the involvement of a positive selection pressure on *PROKR2* mutations in the Maghrebian population.

Introduction

Kallmann syndrome (KS) is a developmental disorder that combines hypogonadotropic hypogonadism, due to GnRH deficiency, and anosmia or hyposmia, related to the absence of the olfactory bulbs and tracts.[1,2] KS is genetically heterogeneous and several causative genes have been identified, including *PROKR2* and *PROK2* that encode prokineticin receptor-2 and prokineticin-2, respectively.[3-12] PROKR2, a G protein-coupled receptor, is one of the two identified receptors to prokineticins-1 and -2,[13-15] a pair of bioactive peptides, which are considered as pleiotropic chemokine-like cytokines.[16] In KS patients, *PROKR2* and *PROK2*

mutations have been found in heterozygous, homozygous or compound heterozygous states.[7,17-20] These genes are thus likely to be involved both in monogenic recessive and digenic/oligogenic transmission modes of the KS.[1] Here, we report on the unexpectedly high prevalence of *PROKR2* mutations in KS patients from the Maghreb, and suggest that it results from a positive selection pressure that may have involved PROKR2-signalling in the inflammatory response to infectious diseases.

Materials and methods

Written informed consent was obtained from all the individuals who participated in the study. Genomic DNAs were obtained from blood samples or lymphoblastoid cell lines using a standard extraction procedure. Each of the coding exons and flanking splice sites of *KAL1*, *FGFR1*, *FGF8*, *PROKR2* and *PROK2* was PCR-amplified and sequenced in every KS patient, using previously reported primers and standard PCR and sequencing conditions.[5-8] In addition, mutations in *PROKR2* were sought in a control group of 164 unrelated Maghrebian individuals, either by direct sequencing of the PCR products or using a denaturing high-performance liquid chromatography standard procedure followed by sequencing of the abnormal products.

Results and discussion

We studied a cohort of 95 unrelated Maghrebian KS patients (M cohort) originating from Morocco, Algeria or Tunisia. In these patients, we sought mutations in the coding part of five KS genes, specifically, *KAL1*, *FGFR1*, *FGF8*, *PROKR2* and *PROK2*, and compared, for each gene, the prevalence of mutations with that found in a cohort of 697 KS patients mainly of European origin (non-Maghrebian, N-M cohort). Much to our surprise, we found that 25/95 patients (26.3%) carried *PROKR2* mutations in the M cohort, whereas only 30/697 patients

(4.3%) did in the NM cohort (Fisher's exact test, $p<0.001$). In contrast, the prevalences of the mutations in *KAL1*, *FGFR1*, *FGF8* and *PROK2* were not statistically different between the NM and M cohorts (Fisher's exact test, $p>0.1$ for all comparisons) (Table 1). In addition, the *PROKR2* mutations were different between the two groups. The main *PROKR2* mutation in the NM cohort was p.L173R that was found in 14/37 (37.8 %) mutated alleles, whereas p.P290S (10/32 mutated alleles, 31.2%), p.R268C (8/32, 25%), and p.R85C (7/32, 21.9%), were the most frequent three out of eight different *PROKR2* mutations found in the M cohort (Tables 2 and 3). These three mutations affect aminoacid residues located in the sixth transmembrane domain, the third and the first intracellular loop of the protein, respectively. The former mutation impairs receptor targeting to the plasma membrane, whereas the latter are likely to impair G protein-coupling of the receptor.[21]

We first asked whether the higher prevalence of *PROKR2* mutations in the M cohort could result from the higher frequency of inbreeding in Maghrebian countries, which has been estimated at approximately 30% of the unions.[22] In the M cohort, the exact proportion of the patients who were born to consanguineous parents was not known, but the ratio of KS patients who carry *PROKR2* mutations in homozygous state to the total number of patients carrying mutations in the gene, specifically, 6/25 (24%) may provide a minimal estimate. However, because the proportion of Maghrebian patients carrying *PROKR2* mutations in heterozygous state (18.9%) was still much higher than that of European patients (3.3%), we were able to conclude that consanguineous marriages do not account for the high prevalence of *PROKR2* mutations in Maghrebian KS patients.

Two basic processes in population genetics can in principle account for the higher prevalence of a mutation in a human group, specifically, population bottlenecks and founder effects. In many respects the two processes are similar since both stem from a reduced size of the ancestral population. Population bottlenecks refer to the reduction in size of a single,

previously larger, population and a loss of prior diversity, while founder effects relate to the process of colonisation and the genetic separation of a subset of the diversity present within the source population. Such effects are, however, unlikely to be involved in this case because various *PROKR2* mutations were found in the Maghrebian patients. Therefore, we suggest that the much higher prevalence of *PROKR2* mutations in the Maghrebian KS patients results from a positive selection pressure on *PROKR2* mutations in the populations of this geographic area. As a corollary, one would expect to find a higher proportion of heterozygous carriers of *PROKR2* mutations in the Maghrebian population than in the European one, for which this proportion has previously been estimated at 4/250 (1.6%).[7] However, this value is not statistically different from that found in our group of control individuals from the Maghreb, that is 6/164 (3.7%, Table 3; Fisher's exact test, $p>0.1$), probably due to the small size of the samples.

A major question raised by the selection pressure hypothesis is how the *PROKR2* mutations, which lead to absent or reduced fertility in the KS patients, could increase genetic fitness in the general population? One possible mechanism is related to parturition. The onset of labour is associated with inflammatory cascades in the utero-placental unit, and these are prematurely activated in preterm labour.[23] Infectious agents, which have been recognised as among the strongest factors of selection pressure in human evolution,[24,25] can induce a premature onset of the pro-inflammatory parturient cascades and preterm delivery.[26] Given the well-described roles for prokineticins in inducing innate immune responses and smooth muscle contractility,[13,27-29] elevated expression levels of prokineticins and their receptors in the utero-placental unit during the third trimester of pregnancy[30-32] makes them likely candidates as activators of the pathways leading to the induction of labour. Their potential activation by infectious agents also makes them possible contributors to preterm labour.[23,32]

We therefore suggest that monoallelic loss-of-function mutations in *PROKR2* may have

undergone positive selection pressure in the Maghrebian population because of their beneficial effect against preterm labour and premature birth resulting from infection during pregnancy.

Why then would the positive selection pressure apply on *PROKR2* mutations but not on the mutations in *PROK2*, which encodes one of the two PROKR2 ligands? Prokineticins activate two closely related G protein-coupled receptors, known as prokineticin receptors 1 and 2. Both receptors are able to bind to prokineticin-1 and prokineticin-2.[15] This apparent non-selectivity of receptor activation by either ligand suggests that the expression profiles and availability of the ligands and receptors in a particular tissue determine which possible ligand-receptor pair(s) is (are) involved in a particular biological process.[16] So it is conceivable that the aforementioned selective effect on parturition involve prokineticin-1, rather than prokineticin-2, signalling through PROKR2.[30,32] Alternatively, mutations in *PROK2* may have undergone negative selection pressure because of their impact on a different biological process relevant to genetic fitness.

Acknowledgements: We thank the patients and family members who participated in this study. We thank the following clinicians for providing us with clinical data and blood samples from their patients: Drs J. Young, M. Pugeat, P. Bouchard, S. Christin-Maitre, R. Braham, P. Touraine, J. Bertherat, P.-F. Bougnères, M.-L. Kottler, S. Abdelhak, S. Cabrol, S. Salenave. This work was supported by a grant from Agence nationale pour la recherche (ANR-09-GENO-017)

References

1 Dodé C, Hardelin J-P: Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2009; **17**:139-146.

2 Teixeira L, Guimiot F, Dodé C *et al*: Defective migration of neuroendocrine GnRH cells in human arrhinencephalic conditions. *J Clin Invest* 2010; **120**:3668-3672.

3 Franco B, Guioli S, Pragliola A *et al*: A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature* 1991; **353**: 529-536.

4 Legouis R, Hardelin J-P, Levilliers J *et al*: The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* 1991; **67**:423-425.

5 Hardelin J-P, Levilliers J, Blanchard S *et al*: Heterogeneity in the mutations responsible for X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Hum Mol Genet* 1993; **2**:373-377.

6 Dodé C, Levilliers J, Dupont J-M *et al*: Loss-of-function mutations in *FGFR1* cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nature Genet* 2003; **33**: 463-465.

7 Dodé C, Teixeira L, Levilliers J *et al:* Kallmann syndrome : mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet* 2006; **2**:1648-1652.

8 Falardeau J, Chung WC, Beenken A *et al*: Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J Clin Invest* 2008; **118**:2822-2831.

9 Kim HG, Kurth I, Lan F *et al*: Mutations in *CHD7,* encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet* 2008; **83**:511-519.

10 Kim HG, Ahn JW, Kurth I *et al*: WDR11, a WD protein that interacts with transcription factor EMX1, is mutated in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome *Am J Hum Genet* 2010; **87**:1-15.

11 Tornberg J, Sykiotis GP, Keefe K *et al*: Heparan sulphate 6-O-sulfotransferase 1, a gene involved in extracellular sugar modifications, is mutated in patients with idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**:11524-11529.

12 Hardelin J-P, Dodé C: The complex genetics of Kallmann syndrome: *KAL1*, *FGFR1*, *FGF8*, *PROKR2*, *PROK2*, et al. *Sex Dev* 2008; **2**:181-193.

13 Li M, Bullock C, Knaeur D *et al*: Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Mol Pharmacol* 2001; **59**:692-698.

14 Lin DCH, Bullock C, Ehlert FJ *et al*: Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 2002; **277**:19276-19280.

15 Soga T, Matsumoto SI, Oda T *et al*: Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochem Biophys Acta* 2002; **1579**:173-179.

16 Ngan ESW, Tam PKH: Prokineticin-signaling pathway. *Int J Biochem and Cell Biol* 2008; **40**:1679-1684.

17 Cole LW, Sidis Y, Zhang C *et al*: Mutations in prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 genes in human gonadotrophin-releasing hormone deficiency: molecular genetics and clinical spectrum. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; **93**:3551-3559.

18 Leroy C, Fouveaut C, Leclercq S *et al*: Biallelic mutations in the prokineticin-2 gene in two sporadic cases of Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2008; **16**: 865-868.

19 Abreu AP, Trarbach EB, de Castro M *et al*: Loss-of-function mutations in the genes encoding prokineticin-2 or prokineticin receptor-2 cause autosomal recessive Kallmann syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; **93**:4113-4118.

20 Sarfati J, Guiochon-Mantel A, Rondard P *et al*: A comparative study of Kallmann syndrome patients carrying monoallelic and biallelic mutations in the prokineticin 2 or prokineticin receptor 2 genes. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; **95**:659-669.

21 Monnier C, Dodé C, Fabre L, *et al*: *PROKR2* missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling-activity. *Hum Mol Genet* 2009; **18**:75-81.

22 Chaabouni-Bouhamed H: Tunisia : communities and community genetics. *Community Genet* 2008; **11**:313-323.

23 Catalano RD, Lannagan TRM, Gorowiec M *et al*: Prokineticins: novel mediators of inflammatory and contractile pathways at parturition ? *Mol Hum Reprod* 2010; **16**:311-319.

24 Manolio TA, Collins FS, Cox NJ *et al:* Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature Rev Genet* 2009; **461**:747-753.

25 Campbell MC, Tishkoff SA: African genetic diversity: Implications for human demographic history, modern human origins and complex disease mapping. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008; **9**: 403-433.

26 Muglia LJ, Katz M: The enigma of spontaneous preterm birth. *N Engl J Med* 2010; **362**:529-535.

27 Schweitz H, Pacaud P, Diochot S *et al*: MIT(1), a black mamba toxin with a new and highly potent activity on intestinal contraction. *FEBS Lett* 1999; **461**:183-188.

28 Martucci C, Franchi S, Giannini E *et al*: Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, induces a proinflammatory phenotype of mouse macrophages. *Br J Pharmacol* 2006; **147**: 225-234.

29 Zhou QY, Meidan R: Biological function of prokineticins. *Results Probl Cell Differ* 2008; **46**:181-199.

30 Denison FC, Battersby S, King AE *et al*: Prokineticin-1: a novel mediator of the inflammatory response in third-trimester human placenta. *Endocrinology* 2008; **149**:3470-3477.

31 Bollapragada S, Youssef R, Jordan F *et al*: Term labor is associated with a core inflammatory response in human fetal membranes, myometrium, and cervix. *Am J Obstet Gynecol* 2009; **200**:104.e1-11.

32 Gorowiec MR, Catalano RD, Norman JE *et al*: Prokineticin-1 induces inflammatory response in human myometrium: a potential role in initiating term and preterm parturition. *Am J Pathol* 2011; **179**:2709-2719.

Genes	NM patients with mutations (%)	NM mutated alleles	M patients with mutations (%)	M mutated alleles
KAL1	43/697 (6.2%)	43	3/95 (3.2%)	3
FGFR1	69/697 (9.9%)	70	5/95 (5.3%)	5
FGF8	2/697 (0.3%)	3	1/95 (1%)	2
PROKR2	30/697 (4.3%)	37	25/95 (26.3%)	32
PROK2	12/697 (1.7%)	14	2/95 (2.1%)	2

Table 1: Frequencies of the mutations in five KS genes in the Maghrebian (M) and non-Maghrebian (NM) cohorts of KS patients

Genotypes	NM patients	M patients
R85C/+	1	3
R85G/+	0	1
R85H/+	4	1
R85L/+	1	0
R117W/+	1	0
R164Q/+	1	0
L173R/+	10	1
W178S/+	0	1
W251L/+	1	0
R268C/+	0	7
P290S/+	1	4
V331M/+	3	0
R85C/R85C	0	2
R85H/R85H	1	0
R85H/L173R	1	0
L173R/L173R	1	1
L173R/Q210R	1	0
R164Q/c.989delC	1	0
M323I/20fsX43	1	0
G234D/R268C	0	1
P290S/P290S	1	3
Total	30	25

Table 2: *PROKR2* genotypes in Maghrebian (M) and non-Maghrebian (NM) KS patients

Nucleotide change	Aminoacid change	Allelic frequency in M patients	Allelic frequency in M controls
c.253C>T	p.R85C	7/190	1/328
c.253C>G	p.R85G	1/190	0/328
c.254G>A	p.R85H	1/190	0/328
c.518T>G	p.L173R	3/190	0/328
c.533G>C	p.W178S	1/190	0/328
c.701G>A	p.G234D	1/190	0/328
c.802C>T	p.R268C	8/190	3/328
c.868C>T	p.P290S	10/190	2/328
Total		32/190	6/328

Table 3: Allelic frequencies of *PROKR2* mutations in Maghrebian (M) patients and control individuals

IV Discussion

IV.1 Caractérisation d'un phénotype clinique des patients porteurs de mutations *PROK2* ou *PROKR2*

Le premier objectif de notre étude était de rechercher des signes cliniques associés spécifiques de la forme génétique de KS liée aux mutations de *PROK2* ou *PROKR2*. En effet, la recherche clinique chez des patients porteurs de mutations dans les 2 premiers gènes KS, *KAL1* et *FGFR1* avait permis d'identifier des signes associés spécifiques ou de fréquence spécifique de ces formes génétiques (cf. Introduction chapitre III.3). L'agénésie rénale, qui est présente chez 30% des patients avec mutations identifiées de *KAL1* (Hardelin et al. 1993; Kirk et al. 1994), n'a jamais été observée chez les patients mutés *FGFR1*, au contraire, les fentes labio-palatines, ne sont elles, retrouvées que chez des patients mutés *FGFR1*. D'autres signes, l'agénésie dentaire, la surdité, les syncinésies controlatérales d'imitation sont, bien que de fréquence variable, partagés par ces 2 formes génétiques de la maladie. La connaissance de ces anomalies cliniques est utile pour la prise en charge globale et anticipée de nos patients. Ces signes précédemment associés à KS ne sont que très rarement observés chez les patients mutés *PROK2* ou *PROKR2*. En effet, seul 1 patient souffre de surdité (*PROK2* H104Y/+), 1 patient d'hypodontie (*PROKR2* R85C/+) et 1 patient de syncinésie bimanuelle (*PROKR2* R85H/+) et aucune fente labio-palatine ou agénésie rénale n'a été observée. La mutation du patient avec surdité n'a pas été de nouveau identifiée dans cette série de patients mais, en revanche, les mutations R85C/+ et R85H/+ ont, elles, été identifiées chez 5 et 4 autres patients respectivement dont 1 à l'état homozygote dans chaque groupe (Tableau 8 et Tableau 9). Une hypodontie et une syncinésie bimanuelle n'ont pas été observées chez ces autres patients. Il ne semble pas que ces mutations soient spécifiquement liées à ce signe clinique Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature où aucune agénésie rénale ou fente labio-palatine n'a été observée chez des patients mutés *PROK2* ou *PROKR2,* où seuls 2 cas de surdité ont été identifiés (1 patient muté *PROKR2* W178S/+ et 1 patient associant une mutation *PROK2* A24P et une mutation *PROKR2* V115M) et 3 cas de syncinésie (*PROK2* I50M/+, *PROKR2* L173R/+ et V331M/+) (Cole et al. 2008). La surdité est la maladie génétique la plus fréquente dans nos populations, il peut s'agir d'une association fortuite non liée à KS.

Au cours de la première étude mettant en évidence la responsabilité de mutations *PROK2* ou *PROKR2* dans KS, 1 patiente porteuse d'une mutation faux sens dans *PROK2* à l'état hétérozygote (R73C/+) souffrait d'une obésité morbide (Dode et al. 2006). La présence d'une

obésité avait été également observée chez 50% des patients porteurs de mutations de *PROKR2* à l'état hétérozygote (L173R/+, L173R/+ et R268C/+) dans une étude ultérieure, mais, cette série ne comprenait que 6 patients porteurs de mutation *PROKR2* (Abreu et al. 2008). Dans notre plus grande série de patients, la moyenne des IMC des patients mutés *PROK2* ou *PROKR2* n'était pas significativement différente de celle de patients KS sans mutation identifiée de *PROK2* ou *PROKR2* appariés par l'âge et cela pour le groupe de patients porteurs de mutation *PROK2* ou *PROKR2* monoallélique et biallélique. Ainsi, la présence de mutation *PROK2* ou *PROKR2* chez nos patients KS ne semblait pas liée à une obésité. Cependant, il est impossible d'exclure chez les KS témoins et chez les KS mutés *PROK2* ou *PROKR2* à l'état hétérozygote, la présence d'un défaut non encore identifié de la voie de signalisation PROKR2. De plus, les 3 mutations *PROK2* (R73C/+) ou *PROKR2* (L173R/+ et R268C/+) précédemment identifiées chez les patients obèses n'étaient pas, chez nos patients, spécifiquement associées à une obésité. Dans notre cohorte, 2 autres patients avaient des mutations R73C de *PROK2*, 1 à l'état homozygote, 1 hétérozygote et aucun des 2 n'était obèse. Dix-sept patients avaient une mutation *PROKR2* L173R (12 hétérozygotes dont 2 avec une mutation *KAL1*, 3 hétérozygotes composites avec une mutation *PROKR2* Q210R et 2 homozygotes), 1 seul d'entre eux (L173R/+) était obèse. Deux patients avaient une mutation *PROKR2* R268C (2 hétérozygotes dont 1 en association avec une mutation *KISS1R*) et aucun d'entre eux n'était obèse. Le lien entre obésité et mutations *PROK2* ou *PROKR2* n'est donc pas établi à ce jour sans qu'il soit possible de déterminer s'il s'agissait initialement d'une association fortuite orientée par le phénotype murin ou si elle était liée à l'atteinte, chez les patients obèses, de mutation dans un autre gène commun.

La patiente obèse (*PROK*2 R73C/+) souffre de troubles du sommeil sévères associés à une inversion du cycle nycthéméral (Dode et al. 2006). Une autre étude signale des troubles du sommeil chez un patient *PROK2* A24P, *PROKR2* V115M/+ (Cole et al. 2008). Dans notre série, seuls 3 nouveaux patients ont des anomalies du sommeil (*PROKR2 :* 2 R85H/+, 1 P290S/+). Des patients avec des génotypes identiques n'ont pas de trouble du sommeil, ces anomalies ne semblent donc pas associées à une mutation précise. La discordance initiale entre le phénotype murin et l'homme nous a décidés à explorer de façon plus précise rythme et sommeil chez nos patients atteints (cf. Résultats et discussion, chapitre 1, II).

Enfin, l'étude décrit la présence de signes cliniques uniquement chez les patients porteurs de mutation hétérozygote de *PROK2* ou *PROKR2* (ou jamais chez les patients porteurs de mutation homozygote de *PROK2* ou *PROKR2)* ce qui n'est pas, en l'état actuel de nos connaissances, en faveur de la responsabilité d'un déficit de la voie de signalisation PROKR2.

IV.2 Complexité des modes de transmission génétique de KS et notion de digénisme

L'HH syndromique et non syndromique a longtemps été considéré comme une maladie monogénique dont les modes de transmission sont récessif lié au chromosome X, autosomique dominant ou récessif. Cependant, il existe une hétérogénéité phénotypique principalement dans les transmissions autosomiques dominantes d'une même famille, illustrée Figure 21 (également chapitre Introduction III.4.1).

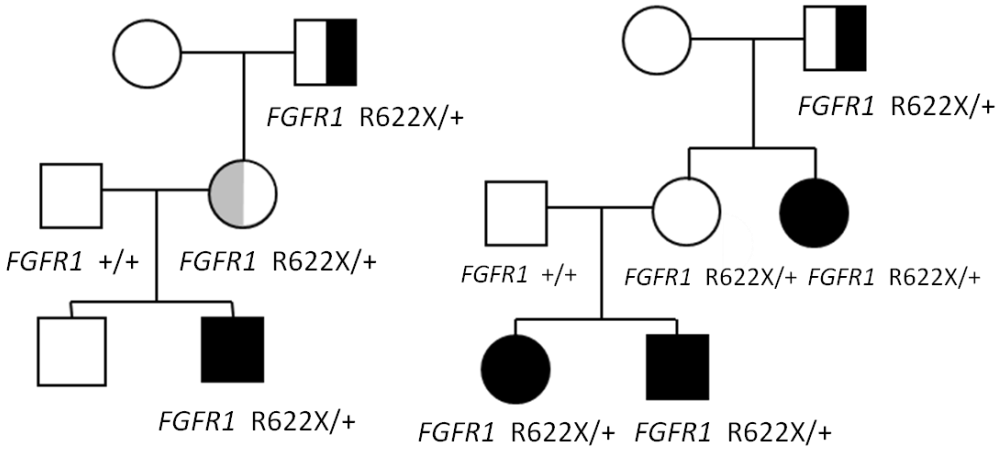


Figure 21: Exemples de variabilité phénotypique de 2 familles KS porteuses d'une mutation R622X de *FGFR1*.
Les symboles pleins sont des patients KS, la moitié droite des symboles reflète l'olfaction (gris: hyposmie, noir: anosmie), la moitié gauche l'atteinte gonadotrope (gris: retard pubertaire, noir: HH). D'après (Dode et al. 2003; Pitteloud et al. 2005).

Récemment, plusieurs maladies décrites initialement comme monogéniques, la rétinite pigmentaire (Kajiwara et al. 1994), le syndrome de Bardet Biedl (Katsanis 2004) ou la surdité récessive non syndromique ont été décrites comme pouvant être dans de rares cas oligogénique soit impliquant plusieurs loci dans la causalité de la maladie (pour revue (Badano and Katsanis 2002). L'expressivité variable de ces mutations peut s'expliquer par la présence de « variations de séquence » dans des gènes modificateurs de l'expression du gène causal. Cette notion peut s'appliquer à des familles dans lesquelles les patients ont des phénotypes plus ou moins graves selon qu'il y a association ou non avec une mutation d'un ou des gènes (s) modificateur(s). Ce n'est à l'heure actuelle qu'une hypothèse, aucune démonstration n'a été rapportée. L'expressivité variable peut aussi se révéler par la présence de signes cliniques associés présents ou non parmi les malades KS d'une même famille. Des mutations de *RAD51* et *DCC* (le récepteur à la nétrine) ont très récemment été trouvées chez des personnes souffrant de syncinésies controlatérales d'imitation n'ayant pas

de phénotype KS (Depienne et al. 2012; Srour et al. 2010). Il serait intéressant de rechercher des mutations dans ces gènes chez nos malades KS qui permettraient d'expliquer ces phénotypes associés.

L'hypothèse du mode de transmission digénique des mutations PROK2 et PROKR2 est exposée dans le chapitre Introduction III.3. En 2006, il a été démontré la première transmission digénique dans le KS chez un patient associant une mutation faux sens de *KAL1* S396L et une mutation faux sens de *PROKR2* L173R/+ (Dode et al. 2006). Il n'a cependant pas été possible d'étudier les parents afin de savoir si chacun deux avait transmis l'une des deux mutations du malade. Bien que ne possédant pas de test fonctionnel pour tester l'effet de la mutation *KAL1*, l'utilisation du logiciel de prédiction structural Polyphen indique que la variation de séquence S396L a un effet probablement délètère (score 0.6).

Nous avons trouvé 5 cas de digénisme dans notre étude associant des mutations entre *PROKR2* monoallélique avec *KAL1* (2 cas), *FGFR1* (1 cas), *GNRHR* (1 cas) et *KISS1R* (1 cas) (Tableau 11). Les cas de digénisme prouvé sont rares car nous n'avons identifié une 2ème mutation de gène responsable de KS ou d'HH normosmique que chez 5 patients parmi 41 patients porteurs d'une mutation monollélique de *PROK2* ou *PROKR2* (Tableau 11). La recherche de digénisme au sein de différentes cohortes de patients HH (normosmiques et KS) observe une proportion variable (de 2.5 à 13%) mais toujours très minoritaire (Quaynor et al. 2011; Shaw et al. 2011; Sykiotis et al. 2010). Mais, aucun gène n'est retrouvé muté chez environ 60% des patients HH ce qui suggère que le nombre de gènes impliqués est beaucoup plus important que ce que l'on a identifié à l'heure actuelle. L'arrivée des nouvelles technologies de séquencage permet d'élargir le champ de la recherche de mutations à de nombreux gènes candidats impliqués dans un phénotype KS murin, dans les voies de signalisation des gènes connus ou dans des pathologies hypophysaires pouvant toucher l'axe gonadotrope.

L'hétérogénéïté des phénotypes gonadotropes et olfactifs des patients porteurs de mutations monoalléliques *PROK2* ou *PROKR2* suggère également la multiplicité des gènes impliqués. Dans le cadre d'une transmission digénique ou oligogénique, le 2ème gène muté peut être différent chez ces malades et associé à des phénotypes hétérogènes.

Le caractère partiellement identifié du génotype de nos patients parait en partie responsable de l'absence d'impact phénotypique observé chez les patients porteurs de mutations sévères de *PROKR2* monoallélique. La présence de mutations dans différents autres gènes KS non identifiés se doit d'avoir également un impact phénotypique.

Dans cette étude un seul cas est familial (*PROKR2* L173R/+, *KAL1* R423X) (Figure 28).

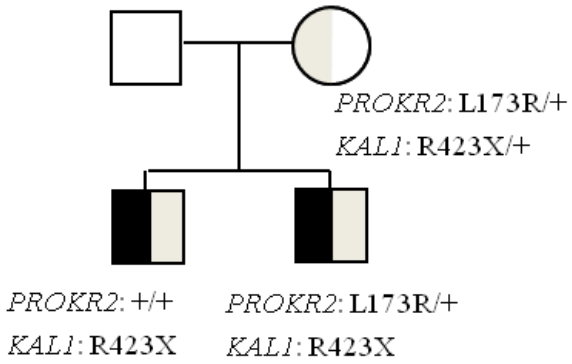


Figure 28: Arbre généalogique du patient porteur des mutations *PROKR2* L173R/+ et *KAL1* R423X. La moitié droite des symboles reflète l'olfaction (gris: hyposmie, noir: anosmie), la moitié gauche l'atteinte gonadotrope (gris: retard pubertaire, noir: HH).

Les deux frères ont un phénotype KS de sévérité comparable certainement du à la présence de la mutation R423X *KAL1*. Les mères transmettrices de mutation *KAL1* n'ont jamais de signe clinique KS. Dans cette famille la mère a un retard pubertaire qui peut probablement s'expliquer par l'association des deux mutations. Par contre l'addition des deux mutations chez l'un des deux fils ne semble pas aggraver le phénotype.

Ainsi, la ségrégation des mutations digéniques identifiées ne permet de mieux comprendre la variabilité phénotypique au sein des différents membres d'une famille que dans certains cas ce qui est illustré par différents exemples dans la littérature. Dans un exemple d'une autre famille HH avec un mode de transmission digénique et triallélique, seules les 2 sœurs ayant les 3 mutations (*GnRHR* R262Q/Q106R et *FGFR1* R470L/+) ont un HH (Figure 29, patiente II.1 et II.3). Ces 3 mutations ont un effet délétère démontré *in vitro* (Bedecarrats et al. 2003; de Roux et al. 1997; Pitteloud et al. 2007a).

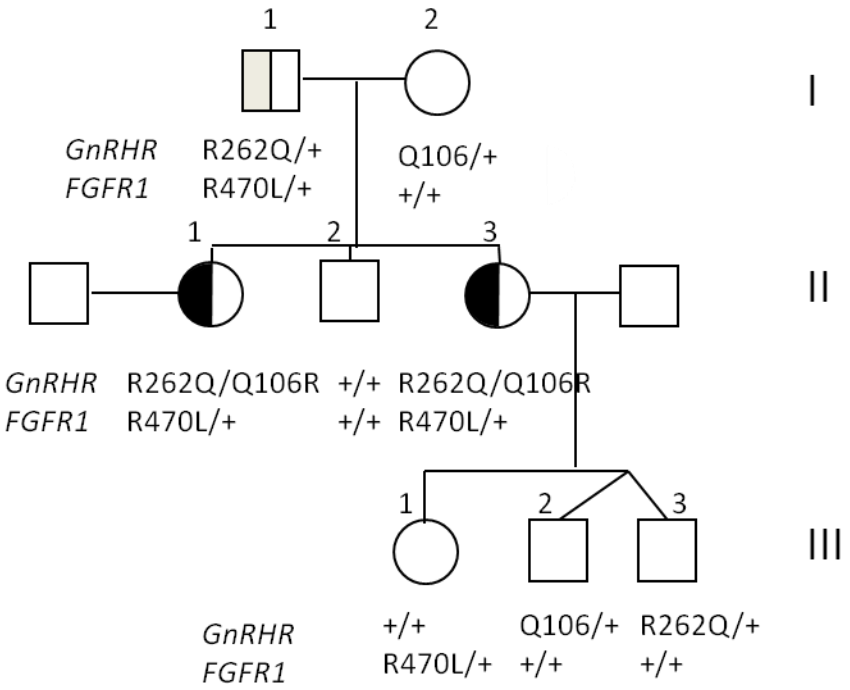


Figure 29: Arbre généalogique d'une famille HH normosmique chez laquelle s'associent des mutations de *FGFR1* et *GnRHR*.
La moitié droite des symboles reflète l'olfaction (gris: hyposmie, noir: anosmie), la moitié gauche l'atteinte gonadotrope (gris: retard pubertaire, noir: HH). D'après (Pitteloud et al. 2007a).

La présence de 2 de ces mutations était associée à un retard pubertaire (I.1 : *GnRHR* R262Q/+ et *FGFR1* R470L/+) et un phénotype normal était observé en présence d'une seule de ces mutations (III.1 : *FGFR1* R470L/+, III.2 : *GnRHR* Q106R/+ ou III.3 : R262Q/+). La sévérité du phénotype en fonction du nombre de mutations dans cette famille suggère un effet synergique de ces différentes mutations. Cependant, seule la patiente III.1 est pubère, le phénotype des frères III.2 et III.3 n'est dit normal que sur l'absence de micropénis et de cryptorchidie (présents chez 30 à 70% des patients selon les séries, cf. Tableau 1). L'exploration olfactive est également limitée puisqu'aucune IRM des BO n'a été réalisée. La compréhension des modes de transmission des gènes KS nécessite un phénotype précis des patients rarement présent dans la littérature. Au sein d'autres familles, il arrive que l'on n'identifie actuellement aucune ségrégation entre l'oligogénisme au sein des gènes connus responsables d'HH et le phénotype des patients.

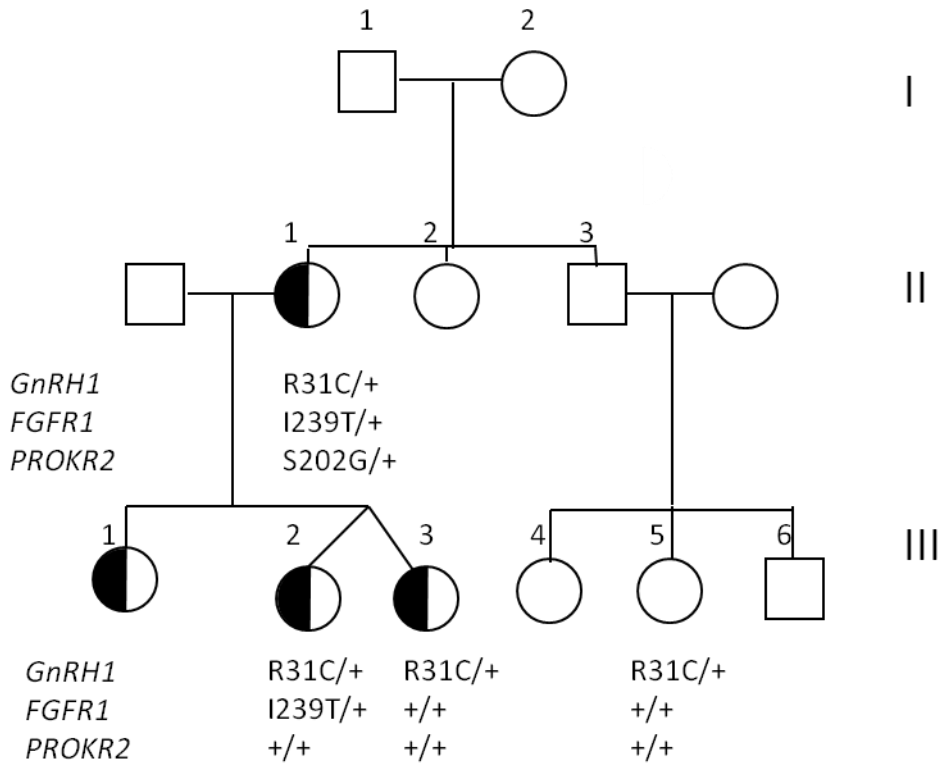


Figure 30: Arbre généalogique d'une famille HH normosmique chez laquelle s'associent des mutations de *FGFR1*, *PROKR2* et *GnRH1*. La moitié droite des symboles reflète l'olfaction (gris: hyposmie, noir: anosmie), la moitié gauche l'atteinte gonadotrope (gris: retard pubertaire, noir: HH). D'après (Chan et al. 2009).

Avant l'identification de mutations *GnRH1* dans l'HH, il apparaissait que l'individu II.1 porteur d'une mutation *FGFR1* I239T/+ et d'une mutation *PROKR2* S202G/+ (Figure 30) avait le même phénotype que l'individu III.2 et III.3 porteurs respectivement de la mutation *FGFR1* uniquement ou d'aucune des 2 mutations (Figure 30). La présence d'un variant au sein d'un 3ème gène plus récemment découvert, *GnRH1* R31C/+ n'a pas permis une meilleure compréhension du phénotype des malades car l'individu III.5 de la même famille est sain et en est également porteur (Chan et al. 2009). De la même façon que pour la famille précédente, aucune exploration olfactive n'est disponible pour cette famille.

A l'inverse dans une autre famille, l'identification d'une mutation additionnelle L173R *PROKR2* dans une famille où une mutation C55fsX45 *FGFR1* avait été précédemment identifiée permettait de comprendre la variabilité phénotypique : Le père (C55fsX45 *FGFR1*) avait une anosmie, une fente labio-palatine et une hypodontie alors que ces filles (C55fsX45 *FGFR1* et L173R *PROKR2*) avaient un déficit en GnRH (Shaw et al. 2011).

L'analyse de ces arbres généalogiques permet d'entrevoir la complexité génétique régissant la transmission du déficit en GnRH où de multiples gènes connus interagissent entre eux, avec des gènes non encore identifiés et avec des facteurs environnementaux. Deux observations semblent être le reflet de la présence de facteurs environnementaux dans la

pathogénèse du déficit en GnRH : le début à l'âge adulte de certains HH isolé après une puberté normale et la possibilité dans environ 10% des cas d'une réversibilité du phénotype d'HH après la mise en route d'un traitement et la normalisation pharmacologique des niveaux de stéroides sexuels (Nachtigall et al. 1997; Quinton et al. 1999; Raivio et al. 2007).

Les 5 patients digéniques présentent un KS qu'ils associent leur mutation de *PROKR2* à une mutation d'un gène *KAL* ou d'un gène d'HH normosmique. Dans ces conditions la présence d'un seul allèle muté de gène KS semble suffire pour déterminer le phénotype KS. Plusieurs cas de digénisme ont été observés dans la littérature et sont résumés dans le Tableau 14.

.

Génotype du 1er gène	Génotype du 2ème gène	Phénotype	IRM BO	Références	
PROKR2 : L173R/+	*KAL1* : S396L/+	KS	Ap	Dodé et al, 2006	Génotype associant des mutations de 2 gènes KS
PROKR2 : V115M/+	*PROK2* : A24P/+	KS	Ap	Cole et al 2008	
FGF8 : F40L/F40L	*FGFR1* : Q764H/D768Y	nHH	ND	Falardeau et al, 2008	
FGF8 : K100E/+	*FGFR1* : R250Q/+	nHH	ND	Falardeau et al, 2008	
FGFR1 : I239T/+	*PROKR2* : S202G/+	nHH	ND	Raivio et al, 2009	
PROKR2 : *S202G/+*	*FGFR1* : I239T/+ et *GnRH1* :R31C/+	nHH	ND	Chan et al, 2009	
PROKR2 : L173R/+	*KAL1* : R423X/+	KS	ND	Notre étude	
PROKR2 : R85L/+	*FGFR1* : A604T/+	KS	ND	Notre étude	
FGFR1 : P745R/+	*FGF8* : Q23L/+	KS	ND	Sykiotis et al, 2010	
KAL1 : C164del/+	*PROK2* : G41D/+	KS	ND	Quaynor et al, 2011	
HS6ST1 : R296W/R296W	*FGFR1* : R250Q/+	KS	ND	Tornberg et al, 2011	
FGFR1 : R470L/+	*GnRHR* : Q106R/R262Q	nHH	ND	Pitteloud et al, 2007	Génotype associant des mutations d'1 gène KS et d'1 gène nHH
FGFR1 : N117S/+	*GnRHR* : L83V/Q106R	nHH	ND	Raivio et al, 2009	
FGFR1 : A671P/+	*GnRHR* : R262Q/+	nHH	NL	Raivio et al, 2009	
PROKR2 : V331M/+	*GnRHR* : R240Q/+	KS	Ap	Notre étude	
PROKR2 :R268C/+	*KISS1R* : A189T/+	KS	Hyp	Notre étude	
KAL1 : R257X/+	*TACR3* : W275X/+	KS	ND	Quaynor et al, 2011	
KAL1 : C164R/+	*WDR11* : H690Q/+	KS	ND	Quaynor et al, 2011	
KAL1 : V587L/+	*WDR11* : K978Q/+	KS	ND	Quaynor et al, 2011	
WDR11 : A435T/+	*GnRHR* : L92P/+	nHH	ND	Quaynor et al, 2011	

Tableau 14: Génotype et phénotype des patients HH porteurs de mutation de 2 gènes HH.
nHH : HH normosmique, ND : non disponible, Ap : aplasie des bulbes olfactifs, Hyp : hypoplasie des bulbes olfactifs, NL : normal. D'après (Chan et al. 2009; Cole et al. 2008; Dode et al. 2006; Falardeau et al. 2008; Pitteloud et al. 2007a; Quaynor et al. 2011; Raivio et al. 2009; Sykiotis et al. 2010).

Certaines associations de gènes mutés sont récurrentes, 3 patients associent mutation de *FGF8* et mutation de *FGFR1*, 3 patients *PROKR2* et *FGFR1*, 3 patients *FGFR1* et *GnRHR*.

Les 2 premières associations peuvent être responsables d'un phénotype KS ou d'un phénotype d'HH normosmique. A ce jour, la présence d'une mutation de *FGFR1* et d'une mutation de *GnRHR* est toujours associée à un phénotype d'HH normosmique. Il est à noter qu'un seul patient HH normosmique a eu une IRM des structures olfactives confirmant le diagnostic, le plus souvent, le diagnostic de normosmie n'est qu'un diagnostic d'interrogatoire et en l'absence d'une IRM des BO, on ne peut pas éliminer une atteinte olfactive. Les tests fonctionnels ne sont pas fournis pour toutes ces mutations ce qui rend difficile l'interprétation d'une corrélation génotype/phénotype.

L'association d'un nombre grandissant de cas nous conforte dans l'idée émise au départ de la possibilité que ce mode de transmission qui permettrait d'expliquer le grand nombre de cas sporadique KS par rapport aux formes familiales.
Cependant les associations citées restent mineures par rapport à la proportion très importante de malade ayant des mutations monoallélique *PROKR2* ou *PROK2* pour lesquels aucune autre mutation n'a été trouvée. Il est possible qu'ils aient une mutation dans un ou des gènes qu'il reste encore à découvrir

IV.3 Conséquences pour le conseil génétique

KS est une maladie génétique qui, avec les progrès thérapeutiques est à risque d'être transmise à la descendance. Il parait légitime que nos patients KS se posent la question du risque de transmission de leur maladie à leur descendance, question à laquelle un conseil génétique tenterait de répondre. En ce qui concerne la forme génétique du KS liée aux mutations *PROK2* ou *PROKR2*, on peut proposer de la diviser en 2 sous groupes, les formes autosomiques récessives et les formes à transmission digénique, mais ces 2 sous groupes restent confrontés au flou laissé par l'impact de mutations de gène non encore identifié. Un patient atteint d'une forme récessive transmettra un seul de ces 2 allèles atteints, il semble alors peu probable que sa descendance soit atteinte mais il n'est pas possible d'éliminer la présence d'une mutation non symptomatique chez le conjoint qui aurait un effet synergique ou additionnel avec la mutation identifiée de *PROK2* ou *PROKR*2. S'il s'agit d'un couple qui a déjà eu 1 enfant porteur de 2 mutations de *PROK2* ou *PROKR2*, on peut penser qu'il a 1 risque sur 4 d'avoir un enfant atteint de nouveau et il semble raisonnable de les rassurer quant à l'absence, à ce jour, de signes cliniques associés entravant le pronostic vital ou fonctionnel. Dans les formes digéniques, les 2 mutations sont sur des gènes indépendants et peuvent être transmises tant de façon concomitante ou non. La descendance d'un patient ayant une forme digénique aura 1 risque sur 4 d'hériter des 2 mutations et il s'y ajoute, la

possibilité de n'hériter que d'une mutation du parent atteint (1/2) et d'une mutation non symptomatique ayant un effet synergique ou additionnel du parent sain.
On ne peut donc pas, à l'heure actuelle, prédire un risque de transmission de la maladie, tant rentre en compte des facteurs non identifiés. Il semble important de sensibiliser la famille sur la possibilité de réaliser un diagnostic d'HH néonatal hormonal par un dosage de testostérone/estradiol et gonadotrophines au cours de la période appelée « mini puberté » (de 2 semaines de vie à 6 mois environ) pouvant aboutir à un traitement néonatal, qui est en cours d'évaluation chez le garçon en présence d'un micropénis (Bouvattier et al. 2011), ou tout au moins permettant d'éviter à la puberté le retard au diagnostic et à la prise en charge qui pourrait retentir sur le bien être psychologique de l'adolescent.

IV.4 Etude rythme et sommeil des patients mutés *PROK2* ou *PROKR2*

Comme nous l'avons vu lors de l'étude des signes associés des patients KS avec des mutations *PROK2* ou *PROKR2*, des troubles du sommeil étaient signalés dés la première étude chez une patiente porteuse d'une mutation *PROK2* R73C/+ (Dode et al. 2006) puis chez 1 autre patient muté *PROK2* A24P et *PROKR2* V115M (Cole et al. 2008). Chez nos 55 patients, 3 nouveaux patients ont des troubles du sommeil (2 R85H/+ et 1 P290S/+). La présence de ces mêmes mutations chez d'autres patients à l'état hétérozygote et homozygote n'avait pas permis de corréler ces génotypes à des troubles du sommeil mettant en doute la responsabilité du génotype dans ces troubles du sommeil. Mais est ce que les autres patients ont-ils des symptômes moins importants passés inaperçus en l'absence d'un questionnaire dirigé à cet effet ? C'est pour tenter de répondre à cette question que nous avons proposé une évaluation plus précise et plus systématique concernant le rythme circadien et le sommeil à nos patients à l'aide de 2 questionnaires de référence. Pour l'analyse de ces résultats, il était nécessaire de comparer les résultats de nos patients KS mutés *PROK2* ou *PROKR2* à d'autres patients ayant un KS non mutés *PROK2* ou *PROKR2* car il n'a jamais été démontré que le KS en soi n'intervient pas dans le rythme et sommeil. Mais, ce sont des témoins chez lesquels il est possible que la voie de signalisation PROKR2 soit atteinte par soit des mutations touchant ces gènes non détectables par les techniques actuelles de génétique moléculaire (dans une région intronique ou une séquence promotrice) soit des mutations dans des gènes de la voie de signalisation non identifiés actuellement. C'est pourquoi nous avons aussi comparé nos résultats à ceux de témoins non KS considérant qu'il était moins probable qu'ils aient, eux aussi, un défaut dans cette voie de signalisation. Il se dégage la présence significativement plus fréquente d'un chronotype du soir chez nos patients mutés en comparaison du groupe KS non muté et du groupe témoin. Cette différence est d'autant plus significative qu'elle évolue dans le même sens que la

redistribution temporelle de l'activité de la souris invalidée Prokr2-/- qui, comme nos patients, décale son activité plus tardivement au cours de sa phase active (Prosser et al. 2007). Ces premières différences se dégagent alors que le nombre de patients est peu important et que les questionnaires sont une méthode efficace mais ne sont pas la méthode la plus sensible pour détecter les anomalies du rythme. En effet, il s'agit de questionnaires sur notre rythme quotidien habituel qui peuvent être le reflet du rythme imposé par les contraintes quotidiennes sociétales et moins laisser transparaitre le rythme endogène, propre de chaque individu. Cela laisse entendre qu'une recherche plus approfondie pourrait mettre à jour des anomalies plus fréquentes chez ces patients.

Ces premiers résultats suggèrent l'absence de retentissement majeur de la voie PROKR2 sur le rythme circadien endogène car 1 seul de nos 55 patients initialement et aucun de nos 13 patients ayant remplis les questionnaires s'est plaint d'une atteinte dans sa vie sociale. Mais, nos patients sont dans la majorité des cas porteurs de mutations non nulles et hétérozygotes de *PROK2* ou *PROKR2*. Si le 2ème gène potentiel atteint responsable du KS ne touche pas la voie de signalisation des prokinéticines, l'atteinte d'un seul allèle pourrait expliquer l'absence de symptômes circadiens majeurs. A l'inverse, chez les patients ayant des troubles rapportés, peut être existe il une atteinte d'un autre gène touchant la voie de signalisation des prokinéticines ou une autre voie impliquée dans la régulation des rythmes ?

IV.5 Etude de la prévalence des mutations *PROKR2* au sein des patients KS originaires du Maghreb.

Dans la population du Maghreb, seules les mutations de *PROKR2* ont une augmentation de prévalence. Nous nous sommes interrogés sur la ou les causes pouvant expliquer la prévalence très significativement augmentée de mutations *PROKR2* dans la population de patients Kallmann Maghrébins.

La première cause aurait pu être la fréquence élevée (estimée à 30%) de mariage consanguin dans ces populations (Chaabouni-Bouhamed 2008). Dans notre série de patients originaires du Maghreb, la proportion exacte de patients nés de mariage consanguin n'était pas connue mais le rapport des patients porteurs de mutations à l'état homozygote sur la totalité de patients porteurs de mutations dans *PROKR2* peut donner une estimation (6/25 soit 24%). Cependant, la proportion de patients Maghrébins porteurs de mutations à l'état hétérozygote était encore significativement plus élevée que celle des patients caucasiens (18.9% vs 3.3%) donc les mariages consanguins ne sont pas la cause de l'augmentation de prévalence de mutation de *PROKR2* chez les patients KS originaires du Maghreb.

En génétique des populations, différents processus aléatoires responsables d'une partie de l'évolution des espèces peuvent être responsables d'une diminution de la diversité génétique ici par le biais d'une augmentation de fréquence d'une mutation au sein d'un groupe : l'effet fondateur et le phénomène de « goulot d'étranglement ». Dans les 2 cas, il existe une réduction de la taille de la population ancestrale soit lorsqu'un petit nombre d'individus se sépare d'une population plus vaste (exemple de la colonisation d'un petit groupe où les populations pionnières ne sont pas le reflet exact de la population de départ) soit par la disparition d'une grande partie de la population initiale suite à, par exemple, des phénomènes épidémiques, une crise climatique ou à une catastrophe. La présence de 3 différentes mutations de *PROKR2* au sein de notre groupe de patients Kallmann originaires du Maghreb rend peu probable l'implication de ces 2 processus classiques de dérive génétique. Ainsi, nous suggérons que cette augmentation de prévalence des mutations de *PROKR2* au sein du groupe de patients Kallmann originaire du Maghreb puisse être secondaire à un effet de pression de sélection positive de ces mutations spécifiques à cette population. De façon associée, nous avons étudié la prévalence de mutations de *PROKR2* à l'état hétérozygote dans une population témoin originaire du Maghreb. En corollaire de l'hypothèse de pression de sélection positive, nous aurions dû trouver une augmentation significative de porteur sain de mutation hétérozygote de *PROKR2* dans la population

générale originaire du Maghreb en comparaison de cette même prévalence au sein de la population témoin caucasienne. Nous avons trouvé une augmentation de la prévalence de mutations de *PROKR2* à l'état hétérozygote chez les témoins maghrébins par rapport aux témoins caucasiens (3.7% vs 1.6% respectivement) mais de façon non significative, probablement du fait de l'insuffisance de taille de notre population témoin. PROKR2 est un des 2 récepteurs des Prokinéticines 1 et 2, impliquées dans des réactions anti-inflammatoires. L'un des mécanismes de sélection positive possible est lié à la mise en route du travail de la grossesse. Le début du travail est associé à des cascades inflammatoires au sein de l'unité utéro-placentaire. Il peut être activé prématurément par des causes endogènes peu connues régulées par l'horloge interne et fœtale ou être déclenché par une cause exogène, princiaplement les agents infectieux (Catalano et al. 2010; Muglia and Katz 2010). Les prokinéticines et leurs récepteurs sont exprimés au sein de l'unité utéro-placentaire au 3ème trimestre de la grossesse (Denison et al. 2008; Gorowiec et al.). Cette expression, leurs implications dans la réponse immunitaire, leurs activations potentielles par des agents infectieux les rend candidates à une contribution de l'activation prématurée du travail (Catalano et al. 2010; Gorowiec et al. 2011). Une perte de fonction de PROKR2 pourrait ainsi avoir un effet bénéfique pour éviter la mise en route d'un travail spontané et un accouchement prématuré secondaire à une infection pendant la grossesse. La fréquence élevée de ces mutations des patients du Maghreb où des maladies inflammatoires spécifiques de cette population sévissent nous suggèrent un lien possible entre ces 2 constatations.

Il ne s'agit que d'hypothèses mais dans quasiment la totalité des exemples où une mutation d'un gène pourrait conférer un avantage sélectif, des preuves de l'avantage ne sont pas trouvées. Un exemple connu est celui des mutations hétérozygotes de la béta globine (responsables d'une drépanocytose à l'état homozygote) et l'acquisition d'une résistance au paludisme (Allison 1954). Pour les autres exemples d'hypothèses de pression de sélection, on ne possède pas de preuves de l'avantage et des explications alternatives existent. Ainsi, la fréquence élevée de maladie de Tay-Sachs dans la population juive ashkenaze pourrait être la conséquence d'une sélection positive, les hétérozygotes pourraient avoir une plus grande résistance aux maladies infectieuses comme la tuberculose mais, cela pourrait être l'effet d'une combinaison de processus de dérive génétique, effet fondateur et goulot d'étranglement car les grands-parents de patients malades et de non malades ne semblent pas être mort de causes différentes (Spyropoulos et al. 1981; Yokoyama 1979). Les juifs ashkénazes sont aussi porteurs d'une plus grande fréquence à l'état hétérozygote d'allèles mutés de la *glucosidase béta acide* (*GBA)* qui à l'état homozygote sont responsables de maladie de gaucher ce qui suggère un avantage hétérozygote mais aucune association entre le génotype hétérozygote et un phénotype n'a pu être établi (Boas 2000; Slatkin 2004).

De nombreux autres exemples de mutations de gènes responsables de maladie à l'état homozygote qui semblent être bénéfiques à l'état hétérozygote existent (mutation de *MEFV* et fièvre méditerranéenne familiale, de *PAH* et phénylcétonurie) mais, la démonstration de la meilleure forme des patients au génotype hétérozygote n'a pas, là aussi, été décrite.

Comment expliquer que cette pression de sélection positive potentielle s'appuie uniquement sur PROKR2 et non l'un de ses ligands, PROK2 ? Les prokinéticines 1 et 2 activent 2 récepteurs (PROKR1 et PROKR2) (Soga et al. 2002). Cette non sélectivité d'activation du récepteur suggère que le profil d'expression et la disponibilité des ligands et récepteurs dans un tissu détermine quelle paire ligand-récepteur est impliqué dans un processus biologique particulier. Il est ainsi possible que l'effet de pression de sélection positive sur la mise en route du travail fasse intervenir le signal PROK1-PROKR2 (Denison et al. 2008; Gorowiec et al. 2011). De façon alternative, les mutations PROK2 pourraient avoir subi une pression de sélection négative à cause de leurs impacts sur un autre processus biologique.

Chapitre 2 :

Caractérisation d'un nouveau gène KS à partir d'une translocation 3,13,18 chez un patient KS.

I Analyse cytogénétique d'une translocation 46, XY, inv (3) (q24q26.32), t (3 ; 13 ; 18) (q26.32 ; q21.2 ; q12.2).

Nous avons collaboré avec une équipe ayant décrit des anomalies chromosomiques chez un malade KS (Kroisel et al. 2004) sporadique (cf. Patients et Méthodes chapitre I.2).
Sa formule chromosomique initiale était 46, XY, inv (3) (q24q26.32), t (3 ; 13 ; 18) (q26.32 ; q21.2 ; q12.2). Cette équipe nous a fourni un prélèvement de sang qui nous a permis d'établir une lignée lymphoblastoïde de ce malade KS porteur d'une translocation complexe. En collaboration avec le service de cytogénétique du Pr Jean-Michel Dupont, nous avons réalisé un caryotype, dont les 3 chromosomes impliqués dans la translocation sont représentés dans la Figure 31 puis nous avons approfondi l'étude cytogénétique par la technique de FISH pour préciser la localisation des points de cassure chromosomique.

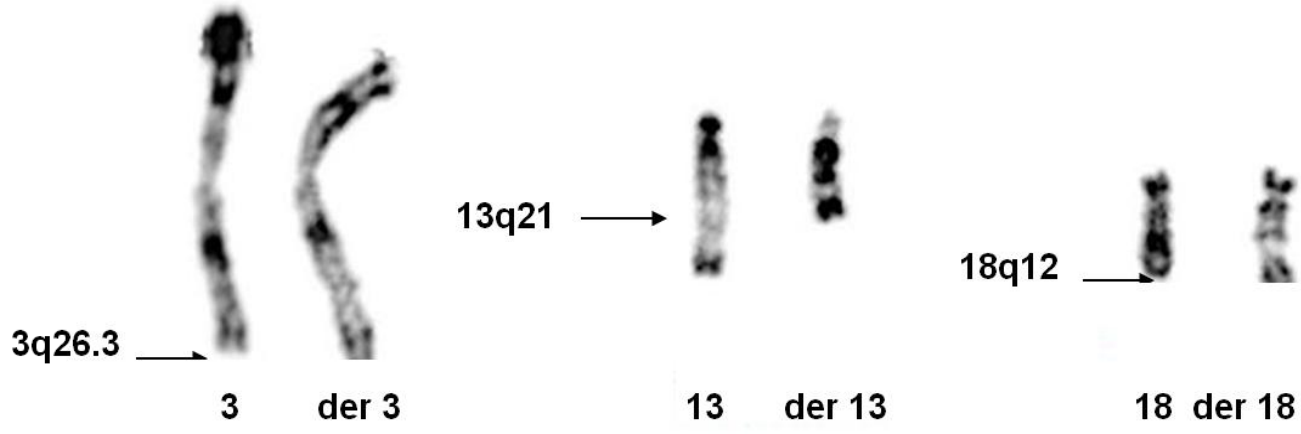


Figure 31: Caryotype partiel des 3 paires de chromosomes (3, 13, 18) porteurs de translocation.
Composition en caryotype standard 300 bandes des 3 paires de chromosomes impliqués dans la translocation chromosomique

Nos analyses cytogénétiques ont montré des erreurs dans l'interprétation initiale du réarrangement chromosomique décrit par Kroizel et al (Kroisel et al. 2004). Il est notamment apparu, sur la base des hybridations de BAC, que le fragment considéré comme inversé du chromosome3 est en fait un fragment inséré en 3q26.31 du chromosome 13. Les BACs nécessaires à l'obtention de ces résultats sont présentés dans le tableau 15.

BACs du Chr 13	Résultats de l'hybridation	BACs du Chr 18	Résultats de l'hybridation	BACs du Chr 3	Résultats de l'hybridation
RP11_244J1	Chr13 et der13	RP11_470B24	Chr18 et der18	RP11_523G9	Chr3 et der3
RP11_432J3	Chr13 et der3	RP11_108G18	Chr18 et der18	RP11_78F6	ininterprétable*
RP11_168G22	Chr13 et der3	RP11_115P21	Chr18 et der18	RP11_396A13	Chr3 et der13
RP11_205B18	Chr13 et der3	RP11_138H11	Chr18 et der3	RP11_118F4	Chr3 et der13
RP11_211D10	Chr13 et der3	RP11_63N12	Chr18 et der3		
RP11_129M14	Chr13 et der18				
RP11_379K8	Chr13 et der18				
RP11_229I7	Chr13 et der18				
RP11_326D19	Chr13 et der18				

Tableau 15 : BACs utilisés pour localiser les points de cassure de la translocation chromosomique complexe t(3;13;18) (q26.3;q21.2;q12.2).
Chr: Chromosome; Der: chromosome porteur de la translocation; *: ce BAC du chromosome 3 cohybride sur le chromosome 18.

I.1 Le chromosome der 3

Le point de cassure est situé en 3q26.31. L'intervalle de localisation se situe entre les BACs RP11_523G9 hybridant sur le chromosome 3 et RP11_396A13 sur le chromosome 13, d'une taille d'environ 420 kb (Figure 32).

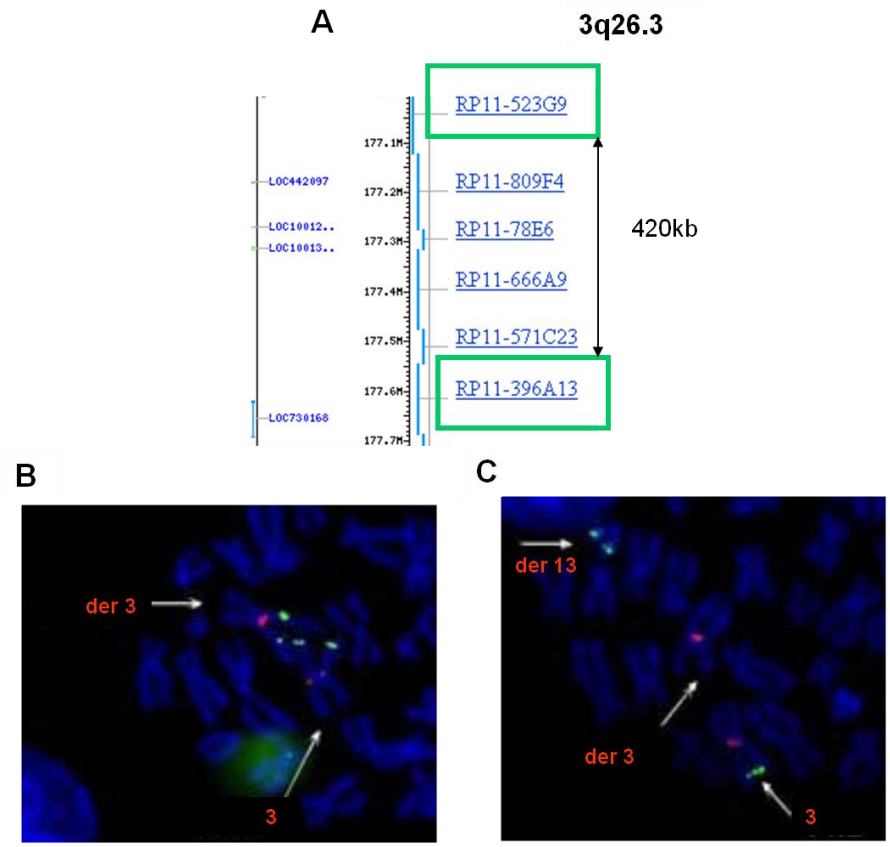


Figure 32: Point de cassure du patient KS en 3q26.3

A : Localisation de la région du point de cassure du chromosome 3q26.3 (version NCBI36/hg18)

B : Hybridation des BAC RP11- 523G9 marqué FITC (vert) et RP11-21I16 témoin du chromosome 3 marqué à la rhodamine (rouge)

C : Hybridation des BAC RP11-396A13 marqué FITC (vert) et RP11-21I16 témoin du chromosome 3 marqué à la rhodamine (rouge).

A la suite de ce point de cassure vient s'intercaler sur ce chromosome der3, 3.8Mb de la région 13q21.2 délimitée par les BAC RP11_432J3 et BAC RP11_129M14 de la région 13q21.32.. Enfin, sur le der 3, s'hybride le BAC RP11_138H11 localisé normalement en 18q12. La formule du der 3 est 3pter→3q26.31 ::13q21.2→13q21.32 ::18q12.1→18qter.

I.2 Le chromosome der 13

Le BAC le plus distal du chromosome 13 localisé sur le der 13 est le BAC RP11_244J1 (Figure 33). Le point de cassure est situé dans une région d'environ 660 kb entre les BACs RP11_244J1 et RP11_432J3 qui hybride sur le chromosome 13 et le der 3. Le BAC RP11_396A13 (3q26.3) s'hybride sur les chromosomes 3 et der 13. La formule du der 13 est donc 13pter→13q21.2 ::3q26.31→3qter.

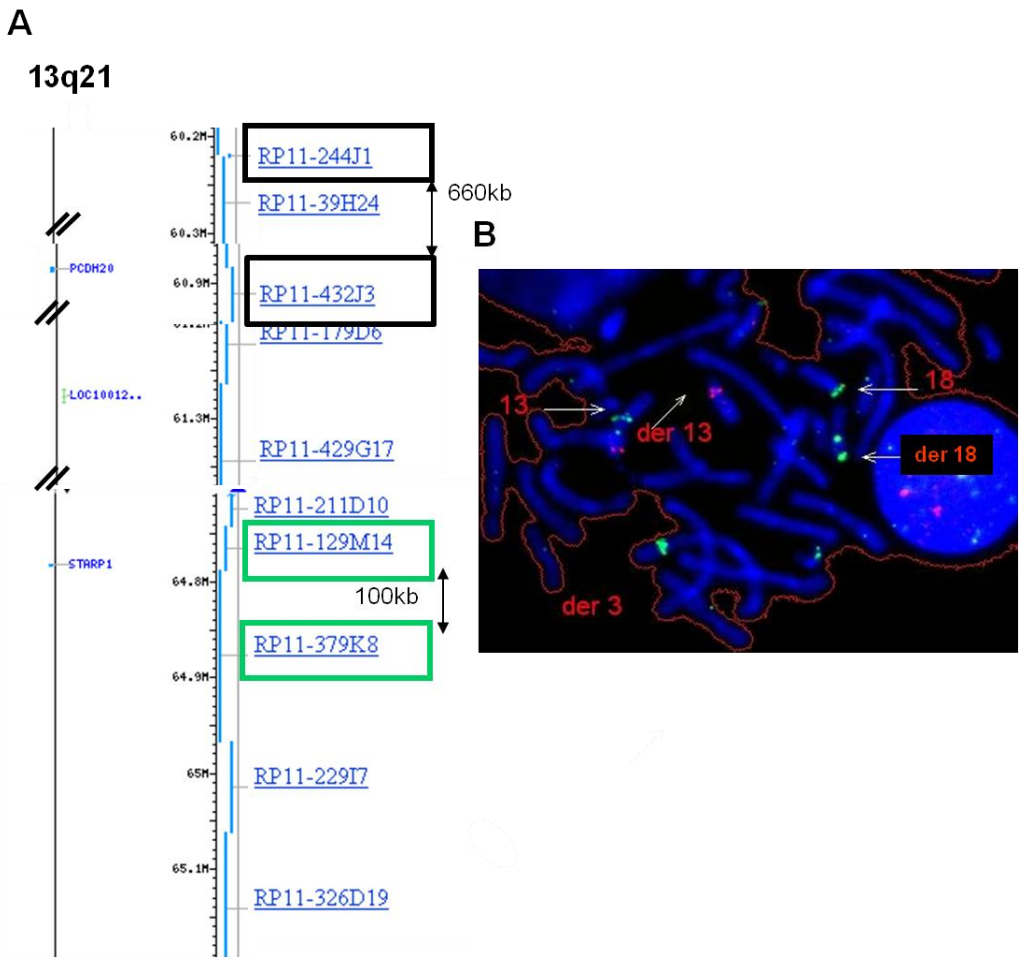


Figure 33: Point de cassure en 13q21.2.

A : Représentation schématique du point de cassure du chromosome 13q21 (version NCBI36/hg18). RP11_244J1 et RP11_432J3 encadrent le point de cassure centromérique en 13q21.2 et les RP11_129M14 et RP11_379K8 encadrent le point de cassure télomérique en 13q21.32.

B : Hybridation des BAC RP11_129M14 et RP11_379K8 marqués FITC (vert) et 2 BACs témoins, RP11_110K18 (en 13q12) marqué à la rhodamine (rouge) et RP11_78H1 (en 18p11) marqué FITC (vert).

I.3 Le chromosome der 18

Le BAC RP11_115P21 est le BAC le plus distal du chromosome 18 s'hybridant sur le der 18 est le BAC (Figure 34). Le point de cassure se situe entre RP11_115P21 et RP11_138H11 qui hybride sur le chromosome 18 et le der 3. La formule du der 18 est 18pter→18q12.1 ::13q21.32→13qter.

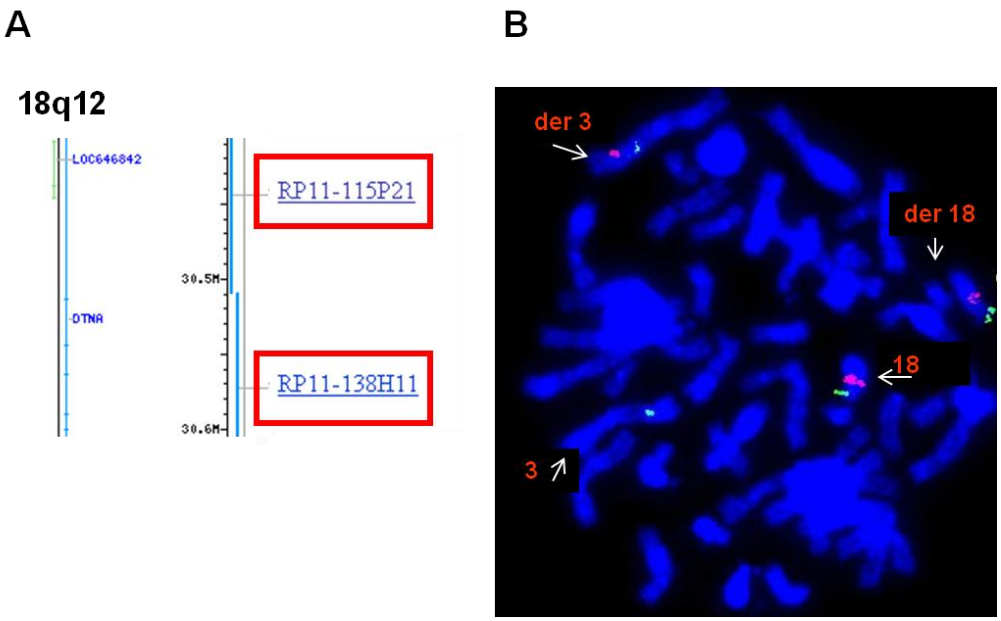


Figure 34: Point de cassure en 18q12

A : Représentation schématique du point de cassure du chromosome 18q12 (version NCBI36/hg18). RP11_115P21 et RP11_138H11 encadre le point de cassure en 18q12.

B : Hybridation des BACs RP11_115P21 et RP11_138H11 marqués à la rhodamine (rouge) et 2 BACs témoins : RP11_48 SC4 (en 3q23) et RP11_78H1 (en 18p11) marqués en FITC (vert).

Au total : Les résultats obtenus ont permis d'établir la formule définitive suivante 46,XY,t(3;13;18)(3pter→3q26.31::13q21.2→13q21.32::18q12.1→18qter;13pter→13q21.2::3q26.31→3qter ;18pter→18q12.1 ::13q21.32→13qter) représentée sur la Figure 35.

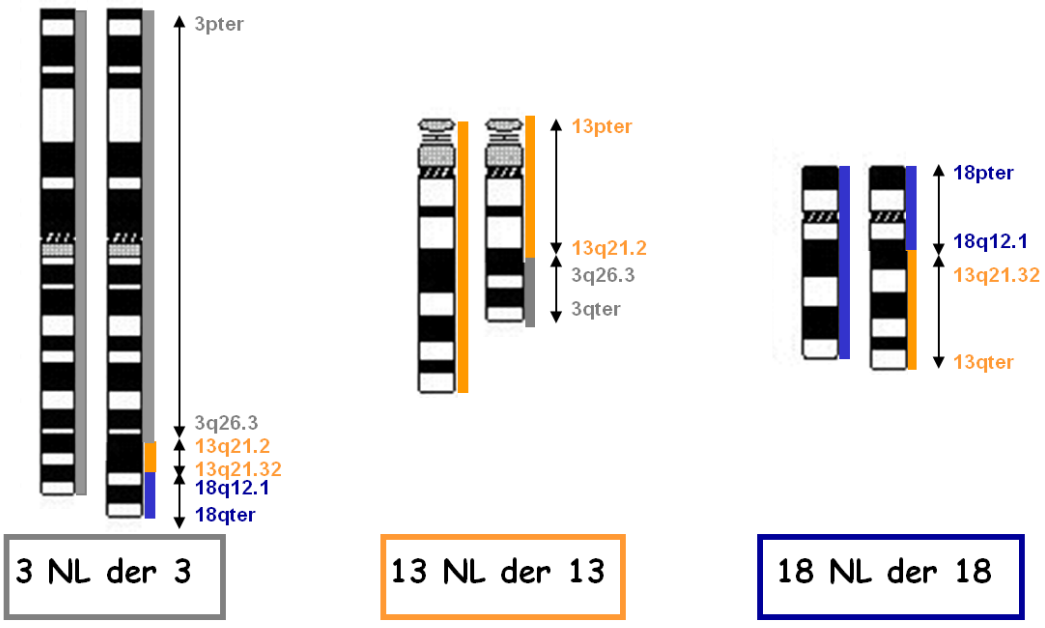


Figure 35: Schéma des paires de chromosomes porteurs de translocation.

Schéma récapitulatif de la formule chromosomique finale avec le chromosome 3 en gris, le chromosome 13 en orange et le chromosome 18 en bleu.

I.4 Cartes des régions de point de cassures chromosomiques

Les bases de données UCSC (genome.**ucsc**.edu) et NCBI (www.**ncbi**.nlm.nih.gov) nous ont permis d'établir la carte des gènes situés dans les régions de cassure chromosomique. Trois pseudogènes se trouvent dans la région du point de cassure en 3q26.31, LOC442097, LOC100129423 et LOC100131216 (Figure 32). Aucun gène n'est prédit par les bases de données dans la région du point de cassure en 13q21.2 (Figure 33A). L'intervalle du point de cassure télomérique en 13q21.32 comprend le pseudogène *STARP1* (steroidogenic acute regulator pseudogene 1) (Figure 33A). La région du point de cassure en 18q12.1 se situe dans la partie 5' du gène codant pour l' alpha dystrobrévine ou *DTNA* (Figure 34A).

L'alpha dystrobrévine possède trois promoteurs tissus spécifiques : Pm cerveau, muscle et cerveau/muscle. La cassure chromosomique se situe entre les promoteurs cérébral et musculaire (Figure 36). Seul le promoteur cérébral est séparé du reste du gène par la cassure chromosomique empêchant la synthèse des isoformes issues de ce promoteur.

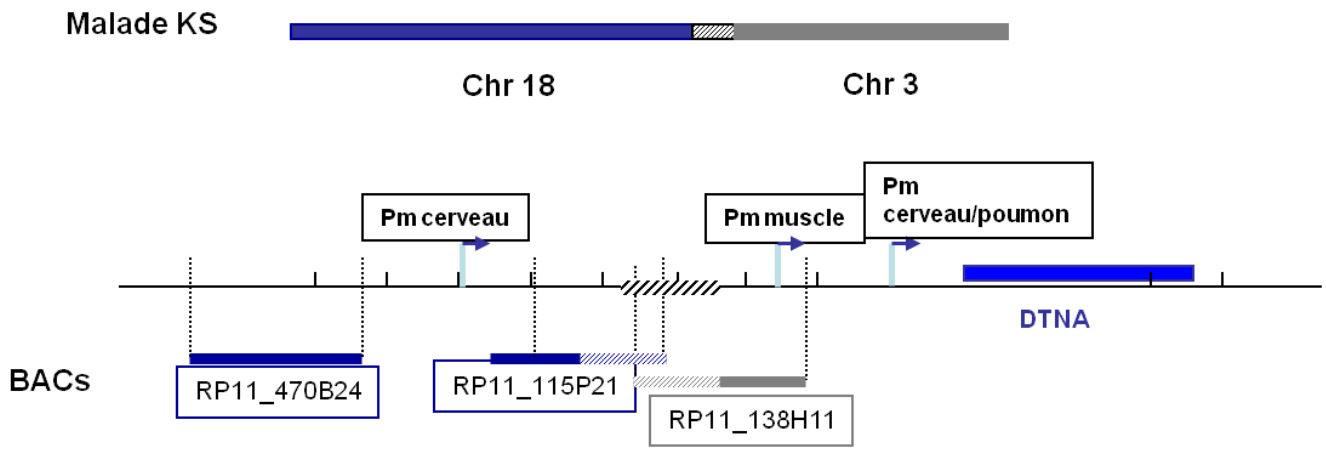


Figure 36: Région du point de cassure chromosomique du malade KS en 18q12.
Les BACs du chromosome 18 présents sur le der 18 sont représentés en bleu, ceux visualisés sur le der3 en gris. La région du point de cassure est représentée en hachurée.

DTNA est le seul gène trouvé dans une région transloquée chez ce malade KS.

Une forme d'anosmie congénitale isolée a été préalablement localisée dans cette même région chromosomique par des calculs de lodscores faits à partir de 2 grandes familles (Ghadami et al. 2004) (Figure 37) (cf. Résultats et discussion, chapitre 2, VII.2).

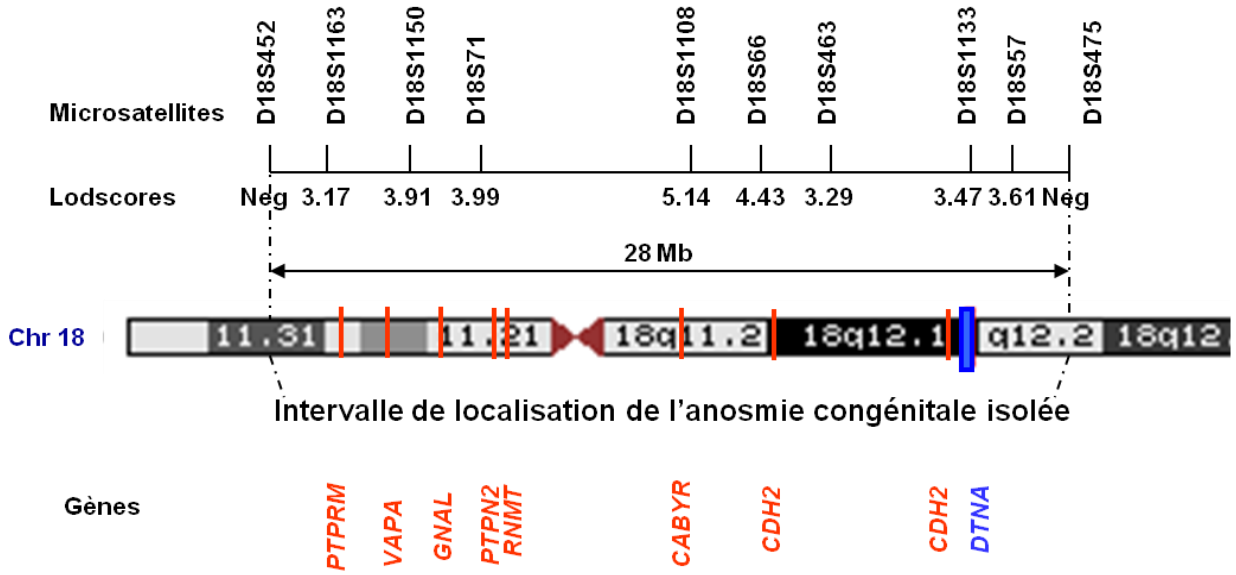


Figure 37: intervalle de localisation de l'anosmie congénitale isolée
Les gènes rouge sont ceux dans lesquels des mutations ont été recherchées chez les patients ayant une anosmie congénitale isolée (Ghadami et al. 2004).

Les auteurs ont effectué une recherche de mutation dans les parties codantes de 8 gènes candidats de l'intervalle (Figure 37). Aucune mutation n'a été trouvée chez les malades des 2 familles. Nous nous sommes intéressés à l'anosmie congénitale isolée car il existe une pénétrance incomplète du KS dans de nombreuses familles porteuses de mutation *FGFR1*. En effet un malade KS a très souvent l'un de ses parents atteints d'une anosmie ou d'une hyposmie sans hypogonadisme.

Plusieurs observations nous ont permis de considérer l'alpha dystrobrévine comme gène candidat de KS :

-Le point de cassure chromosomique de notre malade KS est situé dans la région de localisation de l'anosmie congénitale.

-Seules les isoformes cérébrales sont en théorie affectées par ce crossing over, le reste du gène étant intact.

-La recherche de mutations dans DTNA chez les malades souffrant d'anosmie congénitale n'a pas été faite laissant la possibilité de mutation dans ce gène chez ces malades.

II Recherche d'insertions ou délétions associées à la translocation complexe

Il a été montré récemment que des translocations apparemment équilibrées en cytogénétique conventionnelle pouvaient, en fait, être associées à des délétions dans 40 à 60% des cas (Baptista et al. 2008; De Gregori et al. 2007; Gribble et al. 2005) principalement aux points de cassure. Nous avons donc recherché une délétion, indétectable par la technique FISH, chez notre patient porteur d'une translocation complexe à l'aide de puce CGH 385K. Les résultats sont représentés dans le Tableau 16.

Chr	Type d'indels	Localisation Début-fin	Gènes
2	Délétion	88 900 000-89 200 000	AK128638, S49006, IGK
3	Duplication	101 800 000-101 900 000	GPR128
6	Délétion	32 000 000- 32 100 000	DKFZp779M0311, C2, CFB, RDBP, SKIV2L, DOM3Z, STK19, C4A, C4B, CYP21A2, TNXB
7	Délétion	142 900 000- 143 200 000	AL833583, LOC 441294, DQ786304, FAM115C, AK125491, CTAGE6, FAM115A, BC010225, BC033189, DQ786274
9	Délétion	43 600 000- 43 770 000	AK054645
10	Duplication	89 000 000- 89 222 000	AK309777, AK311174, AK091716, BC036645, CR614919, BC047063, CR609725, BC082979, FAM22D, BC065757
17	Duplication	31 500 000- 31 660 000	TBC1D3C, CCL3L1, CCL4L2, AL832615, PRC17

Tableau 16: Récapitulatif des 7 régions variants en nombre de copie du patient KS porteur de la translocation complexe.

Nous avons trouvé 4 délétions et 3 duplications chez notre patient mais toutes ces variations sont présentes dans la population témoin (Hapmap). Les résultats de la duplication du chromosome 17 sont sur la Figure 38 (le choix de représenter cette duplication est aléatoire). Aucune délétion n'est présente au niveau des cassures chromosomiques.

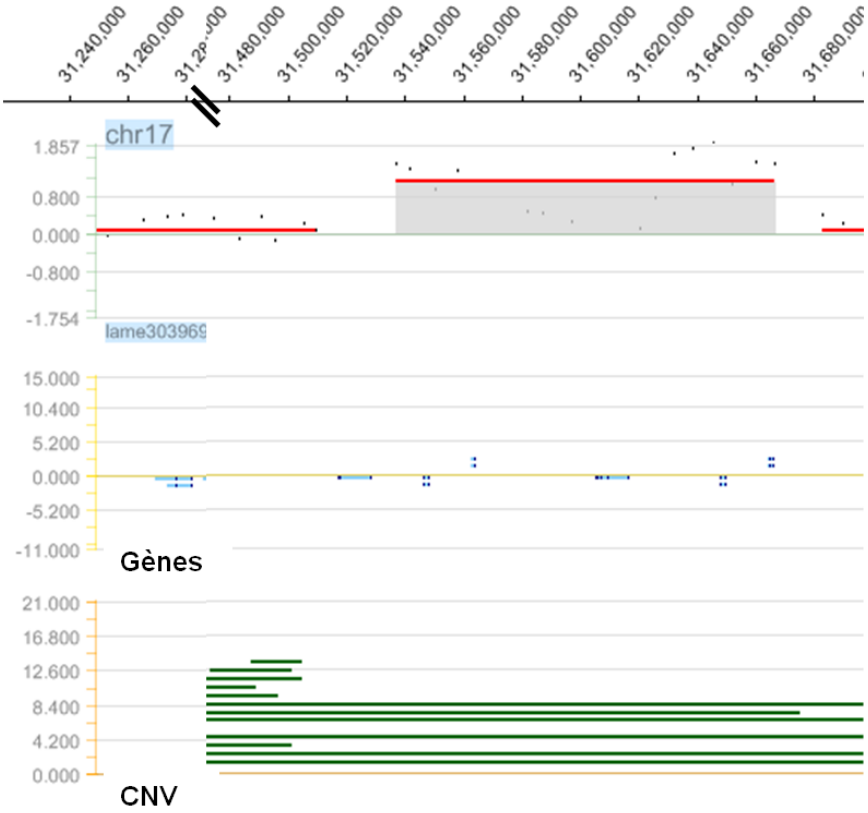


Figure 38: Schéma des résultats des expériences de CGH du chromosome 17 du patient porteur de la translocation 3,13,18 (SignalMap).
La droite rouge égale à 0 représente l'absence d'insertion ou délétion. Les points bleus symbolisent les gènes référencés dans NCBI. Les lignes vertes représentent les CNV répertoriés dans les bases de données.

III L'alpha dystrobrévine

L'alpha dystrobrévine est une protéine qui a été identifiée comme étant associée aux récepteurs de l'acétylcholine de la membrane postsynaptique de l'organe électrique de la torpille (appelée encore raie électrique ou Torpedo) (Sadoulet-Puccio et al. 1996; Wagner et al. 1993). Elle fait partie des protéines associées à la dystrophine. Il n'existe qu'une seule forme de dystrobrévine chez les invertébrés et 2 protéines proches alpha et béta dystrobrévine chez les vertébrés.

III.1 Organisation du gène

Le gène de l'alpha dystrobrévine comprend 25 exons et sa taille est de 440kb. Il existe chez l'Homme, 5 isoformes principales de l'alpha dystrobrévine (Figure 39A) (Blake et al. 1996;

Peters et al. 1998; Sadoulet-Puccio et al. 1996). De plus, il existe 2 régions variables d'épissage alternatif constituées de l'exon 9 et des exons 11, 12, 13 à l'origine de 6 sous isoformes (Figure 39B).

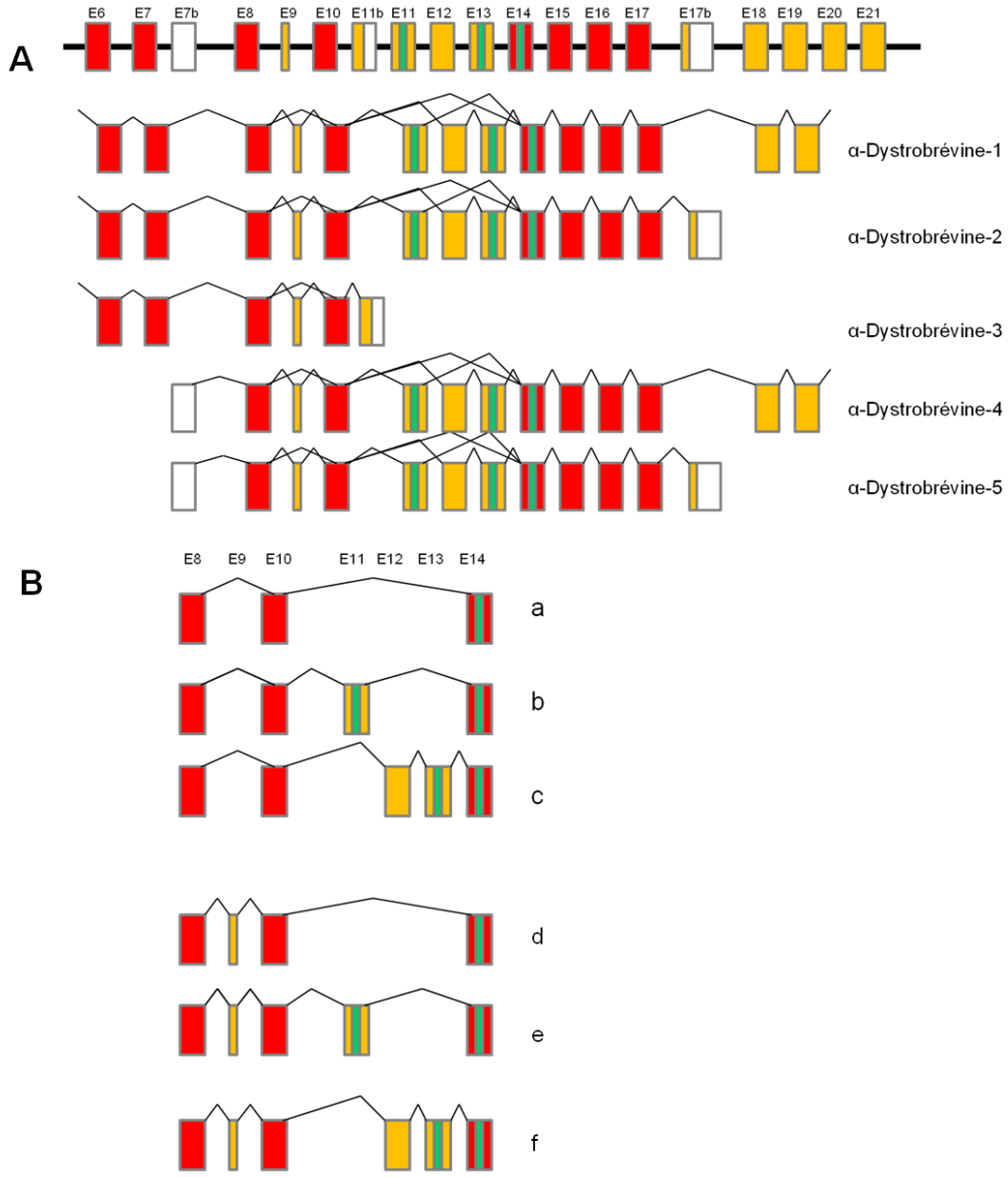


Figure 39: Représentation des différentes isoformes de l'alpha dystrobrévine
Les six possibilités d'épissage alternatif sont classées par l'absence d'exon 9 (a, b, c) ou des exons 11, 12 et 13. Rectangles rouges=exons codants constitutifs, rectangles jaunes= régions avec épissage alternatif, rectangles blancs=exons non codants, rectangles vert=régions codants pour un domaine de liaison à la syntrophine. D'après (Bohm et al. 2009).

Ces différentes isoformes dérivent de 3 promoteurs alternatifs qui sont distribués dans une région de ~ 270kb en 5' du gène et sont activés de façon tissu-spécifique (Figure 36). Une

étude de l'expression tissulaire des différentes isoformes de l'alpha dystrobrévine par RT-PCR quantitative a montré que l'exon 9 était présent chez environ 40% des isoformes 1 et 2 de l'alpha dystrobrévine dans le cerveau et ceux de façon quasi exclusive (Figure 40) (Bohm et al. 2009).

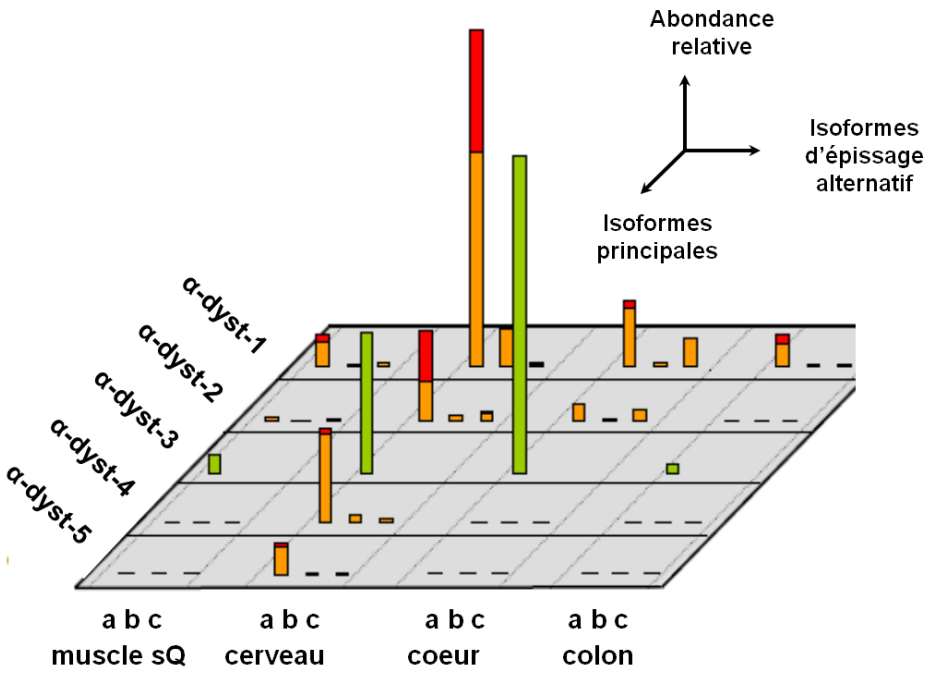


Figure 40: Représentation de l'expression tissulaire des différentes isoformes de l'alpha dystrobrévine.
L'axe horizontal représente les isoformes principales. L'axe vertical montre le niveau d'expression relatif en %. En rouge sont représentées les isoformes contenant l'exon 9, en orange celles sans exon 9 et en vert l'isoforme 3 de l'alpha dystrobrévine selon la numérotation utilisée figure 8. D'après (Bohm et al. 2009).

III.2 Caractéristiques structurales de l'alpha dystrobrévine

La protéine comprend 2 domaines EF (a.a 14-140 et 144-232) constitués d'hélices alpha en épingle à cheveux susceptibles de lier du calcium, un domaine ZZ (a.a 237-284) qui est un site de liaison calmoduline potentiel, 3 sites de liaison syntrophine (a.a 366-391, 422-451 et 452-484), région Vr3, codés par les exons 11, 13 et 14 (Figure 39 et 41), 2 domaines hélice à leucine H1 et H2 (a.a 469-496 et 511-545) formant avec la dystrophine un domaine « hélice-hélice » et 3 sites de phosphorylation d'une tyrosine dans ses isoformes longues (Balasubramanian et al. 1998; Sadoulet-Puccio et al. 1997; Wagner et al. 1993) (Figure 41).

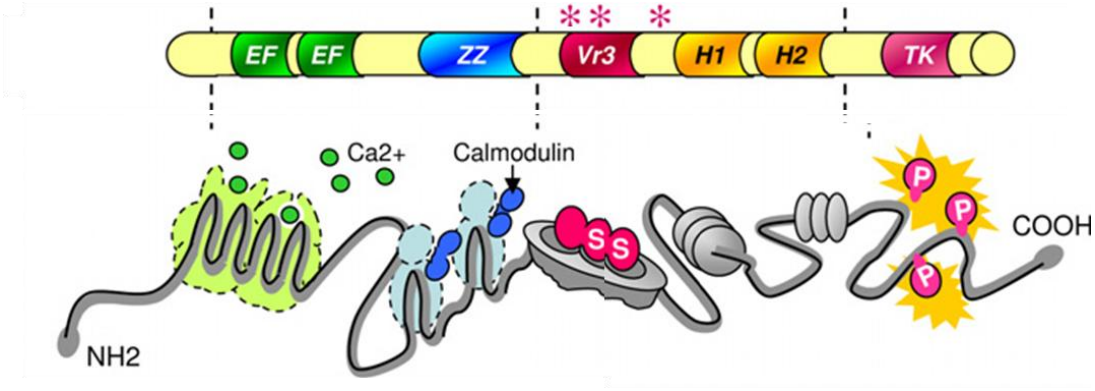


Figure 41: Représentation schématique de l'isoforme la plus longue de l'alpha dystrobrévine.
Astérisques rouge : sites de liaison syntrophine. D'après (Rees et al. 2007)

III.3 Fonction de l'alpha dystrobrévine

L'alpha dystrobrévine appartient au complexe de glycoprotéines associées à la dystrophine initialement décrit dans le muscle. Il peut être subdivisé dans le muscle en 3 sous complexes distincts : le complexe des dystroglycanes, le complexe des sarcoglycanes et le complexe cytoplasmique (Figure 42).

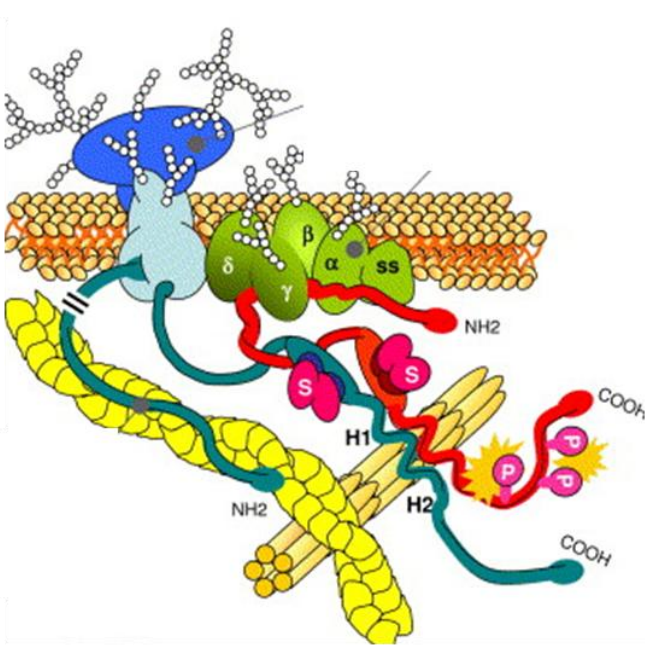
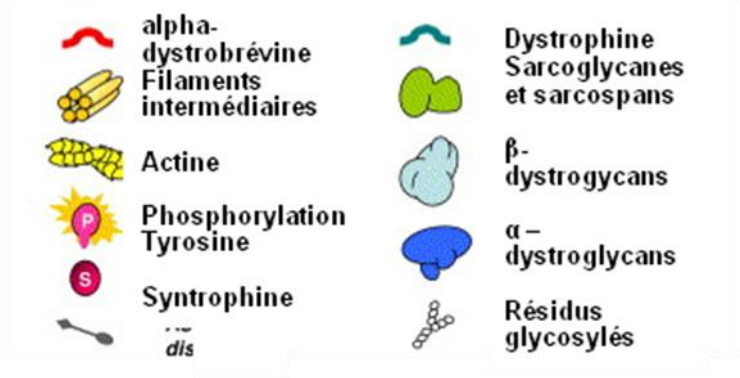


Figure 42: Schéma du complexe de proteines associé à la dystrophine dans le muscle.
(Rees et al. 2007)



Le complexe cytoplasmique comprend notamment la syntrophine et l'alpha dystrobrévine. La dystrobrévine interagit avec la partie C terminale de la dystrophine et avec les syntrophines. La liaison de la dystrobrévine à la dystrophine se fait par leurs domaines C terminal « coiled-coil » et avec la syntrophine par 3 sites de liaison spécifiques (Bohm et al. 2009; Sadoulet-Puccio et al. 1997). Ces 3 sites de liaison sont issus d'épissage alternatif permettant une régulation des liaisons à la syntrophine (Bohm et al. 2009; Newey et al. 2000). Dans le muscle squelettique, l'alpha dystrobrévine se trouve au niveau du sarcolemme et principalement au niveau de la jonction neuro-musculaire suggérant une fonction dans la formation et la stabilité synaptique (Peters et al. 1998). Des assemblages spécifiques de ce complexe « dystrophine like » sont présents dans le cerveau. Au contraire des sarcoglycanes qui ne sont exprimées qu'au niveau des muscles squelettiques et cardiaque, les dystroglycanes et le complexe cytoplasmique sont présents dans de nombreux tissus dont le cerveau. Ainsi, chez le rat, l'alpha dystrobrévine est exprimée dans des cellules gliales, associée principalement à l'isoforme Dp71 de la dystrophine et à la syntrophine (Blake et al. 1999). Cet assemblage dans les astrocytes périvasculaires disparait chez les souris invalidées pour l'alpha dystrobrévine (Bragg et al. 2010). La présence de l'alpha dystrobrévine est donc indispensable au maintien de ce complexe.

Le rôle de ce complexe de glycoprotéines associées à la dystrophine semble être d'une part structural, lien entre le cytosquelette intracellulaire et la membrane extra cellulaire permettant de résister aux forces mécaniques de la contraction des tissus et d'autre part, un rôle dans la signalisation intra cellulaire. En effet, plusieurs protéines de signalisation sont associées au complexe associé à la dystrophine (Rando 2001): la calmoduline et la calmoduline kinase de type II, Grb2 se lie au béta dystroglycane, la nitric oxide synthase neuronale (NOSn) est associée aux syntrophines. Ces différentes molécules permettent des liens entre le complexe et les voies de signalisation PI3K/AKT (via calmoduline kinase), Ras/MAPK (via Grb2) et les voies de survie cellulaire cGMP dépendantes. Un des rôles de l'alpha dystrobrévine dans le complexe semble être une plateforme de recrutement des membres de la famille des syntrophines. Les syntrophines sont des protéines multifonctionnelles d'adaptation qui contiennent 1 domaine PDZ, 2 domaines d'homologie à la pleckstrin et une

région C terminale syntrophine unique. Les syntrophines elles mêmes se lient à différentes protéines dans le cerveau : le domaine PDZ de la NOSn (Brenman et al. 1996), des canaux ioniques (Gee et al. 1998; Schultz et al. 1998) et des sous unités alpha de proteines G hétérotrimériques (Okumura et al. 2008). Cela indique que les syntrophines recrutent des molécules de transduction du signal au complexe de protéines associées à la dystrophine pour réguler le signal intracellulaire. Le NO, produit par l'action de la NOS, a des rôles diverses dans le système nerveux central, associé à des processus dynamiques tels que la migration neuronale, la différentiation, la formation synaptique pendant le développement (Bicker 2005; Gibbs 2003; Truman et al. 1996). Une étude de cerveau crustacé suggère un rôle architectural du NO dans l'établissement des gloméruli olfactifs au cours du développement (Benton et al. 2007). L'inhibition de NO réduit la neurogénèse adulte de l'épithélium olfactif (Sulz et al. 2009). De plus, l'alpha dystrobrévine a aussi été impliquée récemment au sein de la voie de signalisation d'un récepteur couplé aux protéines G (le récepteur alpha1D adrénergique) via le recrutement d'une protéine dont la fonction n'est pas connue, l'alpha catuline (Lyssand et al. 2010). L'alpha dystrobrévine a été associé à d'autres protéines *in vitro* : la dysbindin, DAMAGE (dystrobrévine associated MAGE proteines), la syncoilin et la desmuslin. (Albrecht and Froehner 2004; Benson et al. 2001; Mizuno et al. 2001; Newey et al. 2001). Certains variants du gène codant pour la dysbindin, le dystrobrevin binding protein 1 ou *DTNBP1* ont été associés à la schizophrénie par plusieurs groupes dans des populations indépendantes (Schwab et al. 2003; Straub et al. 2002). La protéine DAMAGE n'a pas de fonction connue, son gène est situé dans une région du chromosome X lié au retard mental, la syncoiline et la desmuslin sont des protéines du filament intermédiaire (Albrecht and Froehner 2004).

En résumé les fonctions de l'alpha dystrobrévine sont encore très largement méconnues et elles n'ont été explorées que majoritairement dans le muscle. Son rôle dans la signalisation cellulaire reste à déterminer.

Une délétion de 2.5kb contenant l'exon 3 de l'alpha dystrobrévine a été générée par recombinaison homologue chez la souris (Grady et al. 1999). Aucune des isoformes connues musculaires et cérébrales sont exprimées chez les homozygotes mutés. Les souris hétérozygotes et homozygotes étaient viables et fertiles. Les muscles des souris homozygotes mutés étaient histologiquement normaux à la naissance mais devenaient dystrophique à 1 mois de vie avec une dégénerescence myofibrillaire et une infiltration monocytaire. Finalement, les souris homozygotes mutées ont un phénotype musculaire modéré au niveau des muscles squelettiques et du muscle cardiaque, sans interruption du complexe lié à la dystrophine ni de lésions du sarcolemme, associé à une structure anormale des jonctions neuromusculaires probablement due à une anomalie des clusters de récepteurs à l'acétylcholine. Une diminution de l'expression de la NOSn associée à la

membrane chez les souris homozygotes pourrait être en lien avec le phénotype observé par modification d'une fonction de signalisation. Aucune autre anomalie évidente n'a été constatée chez les souris homozygotes mutées. Ces anomalies faisaient suggérer aux auteurs que des mutations au sein de l'alpha dystrobrévine pourraient être responsables à elles seules de dystrophie musculaire mais, à ce jour, aucune mutation de l'alpha dystrobrévine n'a été trouvée. Une dissociation phénotypique potentielle entre la souris et l'homme peut s'expliquer par des différences entre les isoformes murines et humaines de l'alpha dystrobrévine. En effet, les isoformes cérébrales 4 et 5 chez l'homme (Figure 39) ne sont pas présentes dans le modèle murin (Bohm et al. 2009).

III.4 Expression de l'alpha dystrobrévine au cours du développement

L'étude de son expression au cours de l'embryogénèse murine décrit des modifications au cours du développement. En effet, dés E8.5 chez la souris, l'alpha dystrobrévine est exprimée au niveau du système nerveux central, principalement au niveau du neuroépithélium et de la crête neurale en développement (Lien et al. 2004). A E9.5, son expression est éparse au sein du cerveau, de la glande hypophysaire en développement, de la moelle épinière, des projections neuronales (Lien et al. 2004). Plus tard au cours du développement, l'expression de l'alpha dystrobrévine diminue pour être nulle dans le cerveau néonatal et réapparaitre à J1 post natal.

III.5 Maladies génétiques associées aux protéines du complexe associé à la dystrophine

Des mutations des gènes codant pour les protéines associées au complexe de la dystrophine sont associées à des maladies génétiques humaines. Les dystrophies musculaires de Duchenne/Becker sont dues à des mutations de la dystrophine. Les myopathies des ceintures (LGMD pour Limb Girdle Muscular Dystrophy) sont associées à des mutations dans les 4 gènes des sarcoglycanes.
Une mutation faux sens de l'alpha dystrobrévine a été identifiée chez des patients d'une famille Japonaise porteurs d'une non compaction ventriculaire isolée ou NCVI, autre cardiomyopathie rare liée à l'arrêt prématuré du développement du myocarde (Ichida et al. 2001). Mais, à ce jour, aucune autre mutation n'a été décrite chez ce groupe de patients.

IV Etude de l'expression de l'alpha dystrobrévine au cours de l'embryogénèse du système olfactif chez la souris

L'objectif de ce travail était de caractériser le profil d'expression de l'alpha dystrobrévine au cours du développement précoce du système olfactif, période de migration des neurones synthétisant la GnRH1 et de préciser la nature des cellules exprimant l'alpha dystrobrévine. Nous nous sommes intéressés à la région du système olfactif périphérique : région nasale et partie rostrale du télencéphale d'où sont issus les BO. Nous avons choisi de mener cette étude sur des coupes d'embryons de souris sauvages de E11.5 à E13.5 par la technique d'hybridation in *situ* puis, après avoir confirmé la présence des transcrits de DTNA au sein du système olfactif, par immunofluorescence afin de caractériser les cellules exprimant l'alpha dystrobrévine.

IV.1 Profil d'expression de l'alpha dystrobrévine au cours de l'embryogénèse du système olfactif murin.

IV.1.1 Expression des transcrits de DTNA

Des expériences d'hybridation *in situ* ont été faites aux stades de développement du système olfactif. L'exon 9 spécifique de la forme neuronale de DTNA ne fait que 9 nucléotides ne nous permettant pas de réaliser une ribosonde neurospécifique. La ribosonde de 921pb que nous avons utilisée ici couvre les exons de 3 à 10 de DTNA. Dès E 11.5, DTNA est exprimé dans l'EO et cette expression semble augmenter au cours du développement jusqu'à E13.5 (Figure 43). A E12.5 et E13.5, DTNA est exprimé dans l'organe voméronasal et dans quelques cellules en cours de migration dans le mésenchyme (indiquées par une flèche dans la Figure 43).

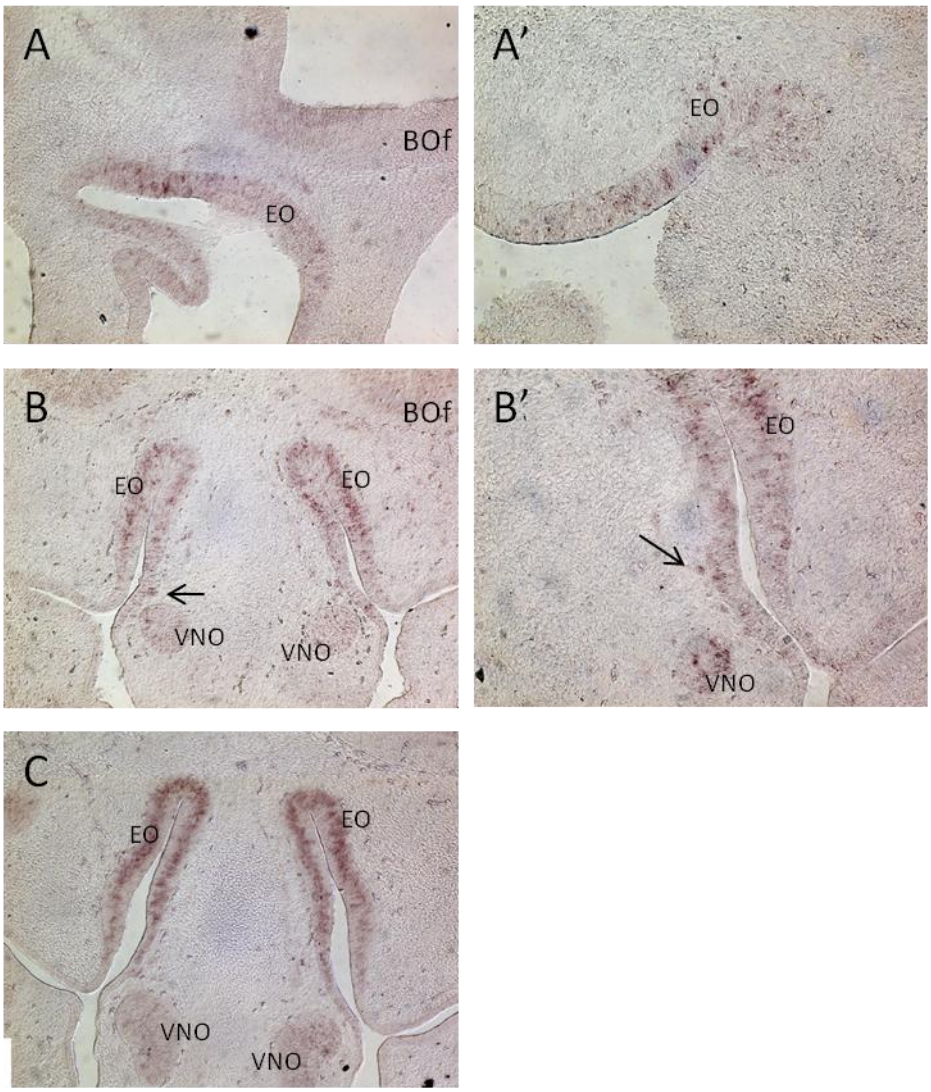


Figure 43: Etude de l'expression en hybridation *in situ* de DTNA au cours de la formation du système olfactif murin.
A et A' : Au stade E11.5 en coupes sagittales au grossissement x10 et x20 respectivement. B et B' : Au stade E12.5 en coupes coronales au grossissement x10 et x20 respectivement. C : Au stade E13.5 en coupes coronales au grossissement x10. eo, épithélium olfactif ; BOf, BO en formation ; vno, organe voméronasal ; les flèches pointent des cellules en cours de migration exprimant DTNA.

IV.1.2 Expression et localisation de l'alpha dystrobrévine

Nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence avec un anticorps anti-alpha dystrobrévine. Ici encore, cet anticorps ne nous permet pas de visualiser spécifiquement la forme neuronale de l'alpha dystrobrévine puisqu'il reconnait toutes ses isoformes.

En immunofluorescence, à E11.5, des cellules exprimant l'alpha dystrobrévine sont visibles dans l'EO, dans l'organe voméronasal en formation et dans la masse migratoire (Figure 44 A et A'). Seules certaines cellules expriment l'alpha dystrobrévine à ce stade-là dans l'EO, ce qui confirme le marquage observé en hybridation *in situ*. L'alpha dystrobrévine est également

localisée de façon peu intense au sein des nerfs voméronasal et terminalis et dans certaines cellules migrantes indépendantes de la masse migratoire (Figure 44 A et A').

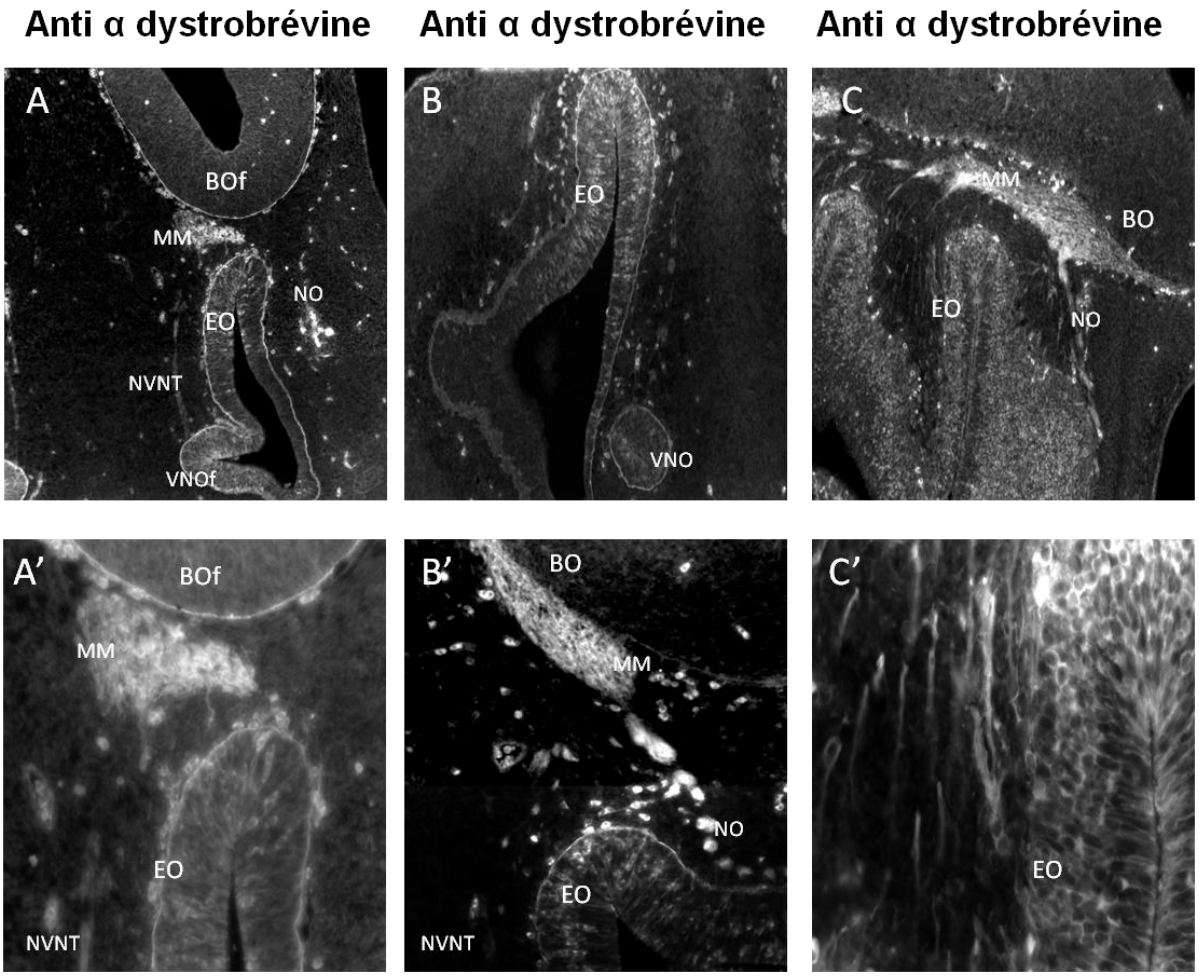


Figure 44: Etude de l'expression par immunofluorescence de l'alpha dystrobrévine dans le système olfactif murin en formation.
A et A' **:** Au stade E11.5 en coupes coronales au grossissement x10 et x20 respectivement. B et B' : Au stade E12.5 en coupes coronales au grossissement x10 et x20 respectivement. C et C' : Au stade E13.5 en coupes sagittales au grossissement x10 et x40 respectivement MM, masse migratoire ; BOf, BO en formation ; EO, épithélium olfactif ; NVMT, nerf voméronasal et terminalis ; NO, nerf olfactif ; vnof : organe voméronasal en formation

A E12.5, l'alpha dystrobrévine est exprimée fortement dans la masse migratoire, dans l'EO et par des cellules migrantes dont la migration débute après celle, précurseur, de la masse migratoire (Figure 44 B et B'). Les nerfs olfactifs sont marqués plus fortement que les nerfs voméronasal et terminalis qui montrent un marquage assez faible (Figure 44 B').
A E13.5, il y a une augmentation du nombre de cellules exprimant l'alpha dystrobrévine dans l'EO (Figure 44 C') comme observé dans les expériences d'hybridation *in situ*. Des cellules migrantes et de la masse migratoire expriment toujours l'alpha dystrobrévine (Figure 44 C).

Tout au long du développement, on ne détecte pas l'alpha dystrobrévine dans l'aire présomptive du BO puis dans le BO.

IV.2 Caractérisation des cellules exprimant l'alpha dystrobrévine

Nous avons caractérisé les cellules exprimant l'alpha dystrobrévine par co-immunofluorescence associant l'anticorps anti-alpha dystrobrévine soit à un anticorps anti-β3-tubuline, marqueur de neurones différenciés, soit à un anticorps anti-GnRH1.
A tous les stades de l'embryogénèse étudiés, dans l'EO, la masse migratoire et les cellules migrantes, les cellules co-expriment l'alpha dystrobrévine et la β3-tubuline. Les cellules exprimant l'alpha dystrobrévine sont des neurones différenciés (Figure 45 A, B, C). Cependant, tous les neurones différenciés n'expriment pas l'alpha dystrobrévine.

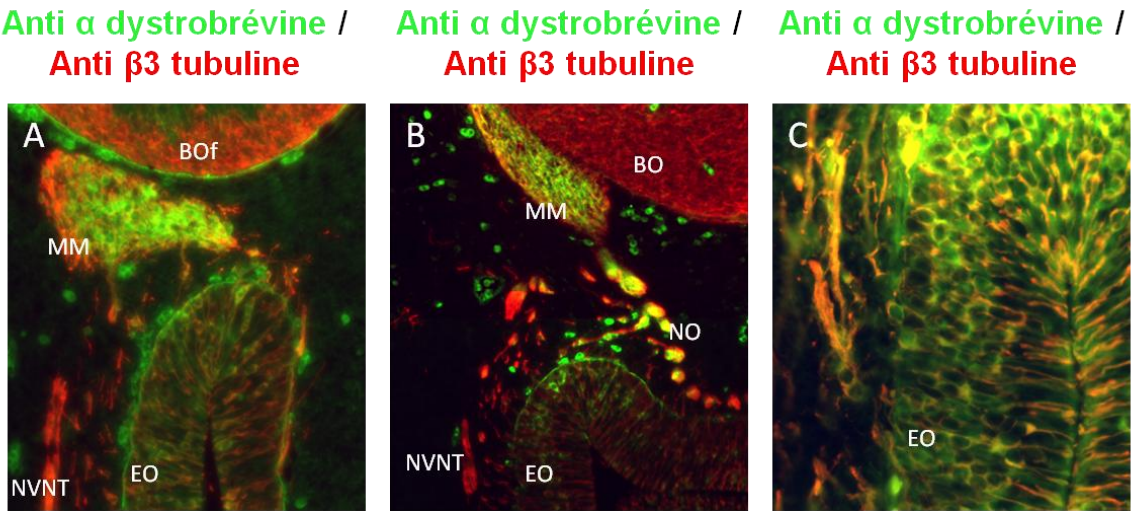


Figure 45 : Caractérisation des cellules exprimant l'alpha dystrobrévine au cours du développement murin par co-immunofluorescence alpha dystrobrévine/β3tubuline.
A : Au stade E11.5 en coupe coronale au grossissement x20. B : Au stade E12.5 en coupe coronale au grossissement x20. C : Au stade E13.5 en coupe sagittale au grossissement x40. MM, masse migratoire ; BOf, BO en formation ; EO, épithélium olfactif ; NVMT, nerf voméronasal et terminalis ; NO, nerf olfactif.

Dans la masse migratoire, certains neurones co-expriment l'alpha dystrobrévine et la GnRH1 (cellules marquées par des flèches rouges dans la Figure 46). Toutefois, Il existe également des neurones exprimant exclusivement soit l'alpha dystrobrévine (marqués par des têtes de flèche blanches, Figure 46) soit la GnRH1 (marqués par une flèche blanche, Figure 46).

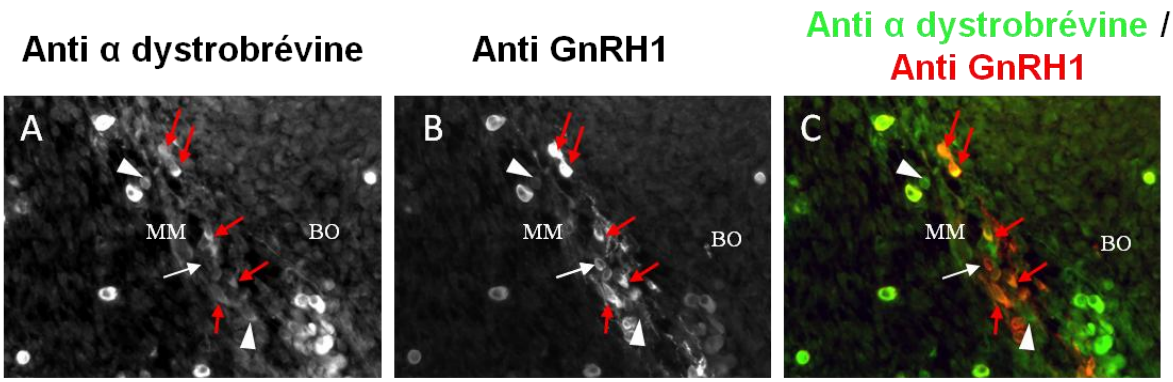


Figure 46 : Caractérisation des cellules exprimant l'alpha dystrobrévine au cours du développement murin par co-immunofluorescence alpha dystrobrévine/GnRH1.
A,B,C : Au stade E12.5 en coupes coronales au grossissement x40. A : Visualisation des cellules marquées par l'anticorps anti alpha dystrobrévine ; B : Visualisation des cellules marquées par l'anticorps anti GnRH1, C : superposition des marquages anti-dystro et anti-GnRH1. Flèches blanches: cellules exprimant GnRH1, têtes de flèches blanches: cellules exprimant l'alpha dystrobrévine, flèches rouges: cellules exprimant les deux. MM, masse migratoire ; BO, Bulbe olfactif.

Nous avons donc mis en évidence une expression progressive de l'alpha dystrobrévine dans les neurones différenciés du système olfactif périphérique de E11.5 à E13.5 au niveau de l'épithélium olfactif. L'alpha-dystrobrévine est localisée dans des cellules migrantes depuis l'EO, au sein de la masse migratoire ainsi que le long des axones des nerfs optiques, voméronasal et terminalis. Certains de ces neurones co-expriment la GnRH1. Ces résultats vont dans le sens d'une implication de l'alpha dystrobrévine dans la pathogénie du KS.

V Recherche de mutations au sein de l'alpha dystrobrévine

Nous avons recherché des mutations par amplification PCR suivie soit de DHPLC soit de séquençage direct, dans les exons de la séquence codante de la dystrobrévine alpha et au sein des exons du promoteur cérébral de la dystrobrévine alpha chez 120 patients Kallmann non liés génétiquement. Nous avons identifié 4 variations de séquence non décrites initialement dans les bases de données (NCBI database for SNP), chez 3 patients KS, V334I et IVS8-35 G>A chez une patiente, IVS17+82 C>G et IVS5+45 G>C chez 2 autres patients respectivement. Les variations IVS17+82 C>G et IVS5+45 G>C ont été trouvées à la fréquence de 1/70 dans la population témoin. Les mutations trouvées dans la 1ère série de malades KS ne sont localisées que dans les exons 8 et 9, nous avons donc, dans une 2ème série de 198 patients Kallmann non liés génétiquement, séquencé exclusivement les exons 8 et 9 de l'alpha dystrobrévine. L'exon 9 est un exon alternatif de 9 nucléotides codant pour 3

acides aminés, DTW, présent quasi exclusivement au sein des isoformes cérébrales de l'alpha dystrobrévine (Figure 40). Il est à noter que la présence ou non de DTW ne modifie pas le reste de la séquence de l'alpha dystrobrévine. Nous avons identifié 4 variations de séquence chez 2 patients KS : IVS8-34 G>A, S311S (c.933C>T) et I333I (c.999C>T) chez un patient et V334I chez un second patient. Au total, 5 variations de séquences chez 3 patients Kallmann ont été trouvées et uniquement au sein de l'exon 8 et de l'IVS8, elles sont représentées sur la Figure 47, 48 et 49.

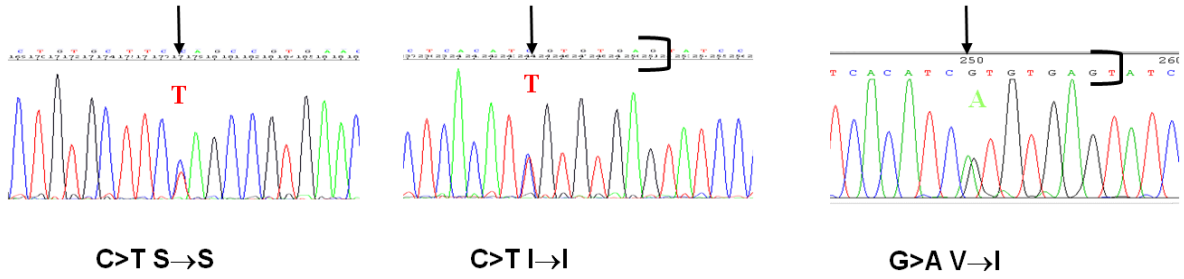


Figure 47 :Electrophorégrammes des mutations de l'exon 8.

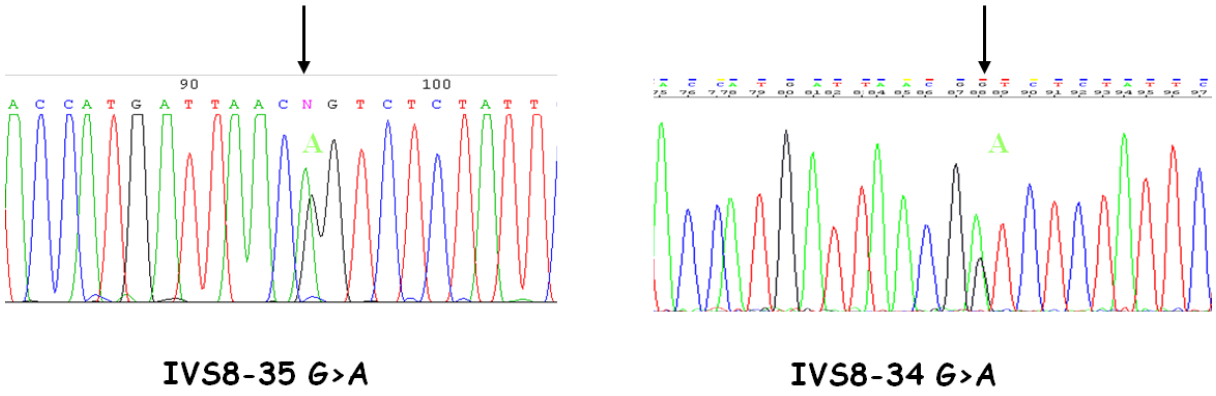


Figure 48 : Electrophorégrammes des mutations de l'IVS 8.

Chez les malades MHF et BB, nous avons trouvé respectivement 2 et 3 variations de séquence dans l'exon 8 et dans l'IVS8. Malheureusement, il s'agit de syndrome de Kallmann sporadique et nous n'avons pas pu obtenir les ADNs de leurs parents respectifs afin de connaitre la ségrégation allélique de ces mutations.

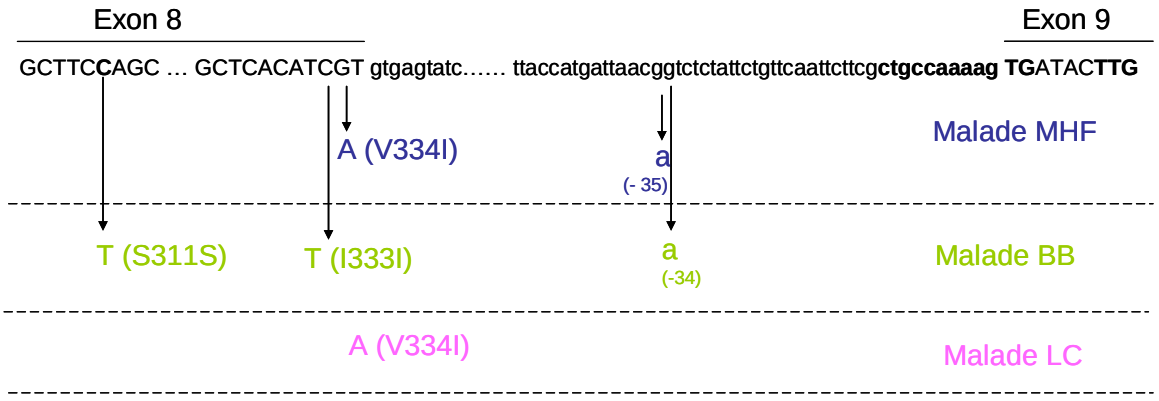


Figure 49: Schéma des 5 mutations de l'alpha dystrobrévine chez les 3 patients KS

Deux des variations de séquence de l'exon 8 (V334I G>A et I333I) pourraient affecter l'épissage normal du fait de leur position terminale dans l'exon (Figure 49). Selon les prédictions *in silico* de Human splicing Finder, la mutation V334I pourrait diminuer la force du site consensus donneur d'épissage, les mutations I333I et S311S modifieraient des sites de liaison de protéines SR participant à l'épissage (respectivement Srp40/SRp55 et SC35) (Figure 50).

V334I

attacataaatattagctgttgtcacttctgccttccttcttctttccagAAATCACCTGCTAAGAAGCTGACTAATGCATTAAGCAAGTCC
CTGAGCTGTGCTTCCAGCCGTGAACCTTTGCACCCCATGTTCCCAGATCAGCCTGAGAAGCCACTCAACTTG
GCTCACATCAT**gt**gagtatccctaccctcccagtat

~~ESE SRp55~~

Disparition du site donneur d'épissage -38%

I333I

attacataaatattagctgttgtcacttctgccttccttcttctttccagAAATCACCTGCTAAGAAGCTGACTAATGCATTAAGCAAGTCC
CTGAGCTGTGCTTCCAGCCGTGAACCTTTGCACCCCATGTTCCCAGATCAGCCTGAGAAGCCACTCAACTTG
GCTCACATTGT**gt**gagtatccctaccctcccagtat

~~ESE Srp40/SRp55~~

S311S

attacataaatattagctgttgtcacttctgccttccttcttctttccagAAATCACCTGCTAAGAAGCTGACTAATGCATTAAGCAAGTCC

~~ESE SC35~~

CTGAGCTGTGCTTCTAGCCGTGAACCTTTGCACCCCATGTTCCCAGATCAGCCTGAGAAGCCACTCAACTTG
GCTCACATCGT**gt**gagtatccctaccctcccagtat

Figure 50: Prédiction *in silico* des conséquences sur l'épissage des mutations de l'exon 8 selon human splice finder 2.4. Site accepteur d'épissage en bleu, site donneur d'épissage en rouge. En gras, le nucléotide muté.

En revanche, selon fruitfly (www.fruitfly.org/), les scores du site donneur d'épissage seraient modifiés pour V334I et I333I avec une augmentation pour V334I et une diminution pour I333I du site donneur d'épissage consensus. Selon fruitfly, la mutation S311S n'influerait en rien sur les sites d'épissage (Figure 51).

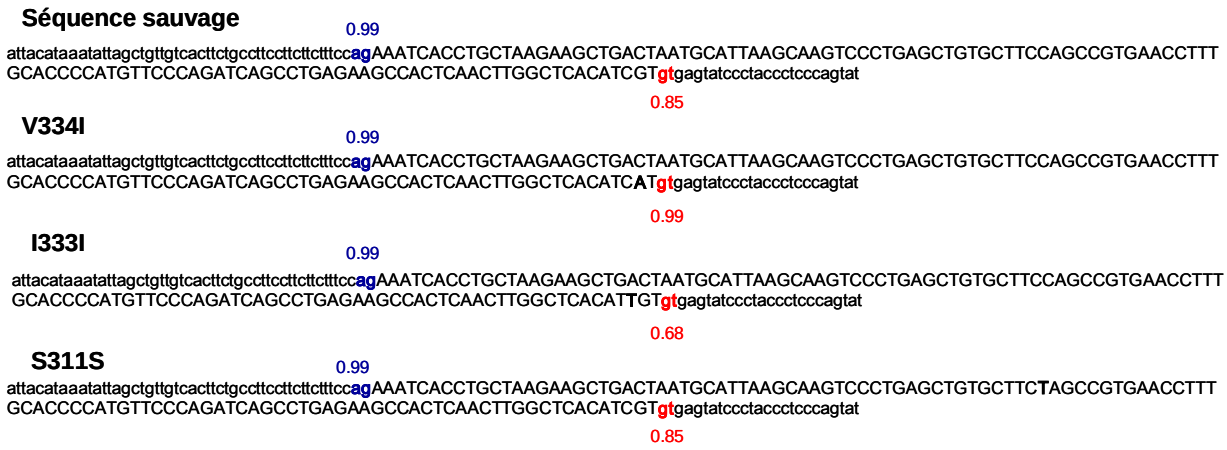


Figure 51: Prédiction *in silico* des conséquences sur l'épissage des mutations de l'exon 8 selon fruitfly.org.
Site accepteur d'épissage en bleu, site donneur d'épissage en rouge, des scores leurs sont attribués en dessous. En gras, le nucléotide muté.

La région DTW est très conservée dans l'évolution et constitue un argument supplémentaire de son rôle important dans la fonction de la protéine (Figure 52).

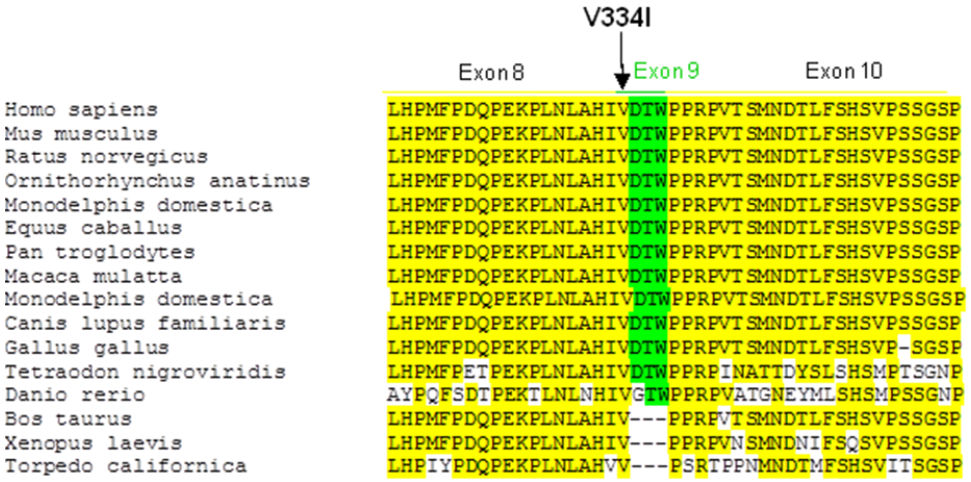


Figure 52 : Alignement multiple de la séquence protéique encadrant les 3 acides aminés codés par l'exon 9 de l'alpha dystrobrévine et de ses orthologues.
Les 3 acides aminés de l'exon 9 sont en vert, les acides aminés des exons 8 et 10 sont en jaune, les acides aminés non conservés ne sont pas colorés. La position de la Valine affectée par la mutation V334I est pointée par une flèche.

La variation IVS8-35 G>A pourrait, elle aussi, affecter l'épissage du transcrit. Elle pourrait créer un site cryptique d'épissage dans la mesure où, la variation de séquence reproduit, 33 bases en amont, la séquence **agT** consensus du site accepteur d'épissage de l'IVS8. L'utilisation du programme Human splicing finder semble confirmer cette hypothèse en

notant l'apparition d'un nouveau site accepteur d'épissage avec la variation IVS8-35 G>A à +58% associé à la disparition d'un site donneur à un score de -15%. Cet effet n'est pas trouvé avec la mutation IVS8-34 G>A, le programme de Human splice Finder ne trouvant qu'une disparition minime d'un site donneur (Figure 53).



Figure 53: Prédiction *in silico* des conséquences sur l'épissage des mutations de l'IVS 8 selon human splice finder 2.4. Site accepteur d'épissage en bleu, site donneur d'épissage en rouge. En gras, le nucléotide muté.

En revanche selon fruitfly.org, un autre système de prédiction *in silico* d'altérations d'épissage, les mutations d'IVS8 ne créeraient pas de site alternatif accepteur d'épissage et ne modifieraient pas les scores des sites accepteurs et donneurs d'épissage de la séquence sauvage (Figure 54).

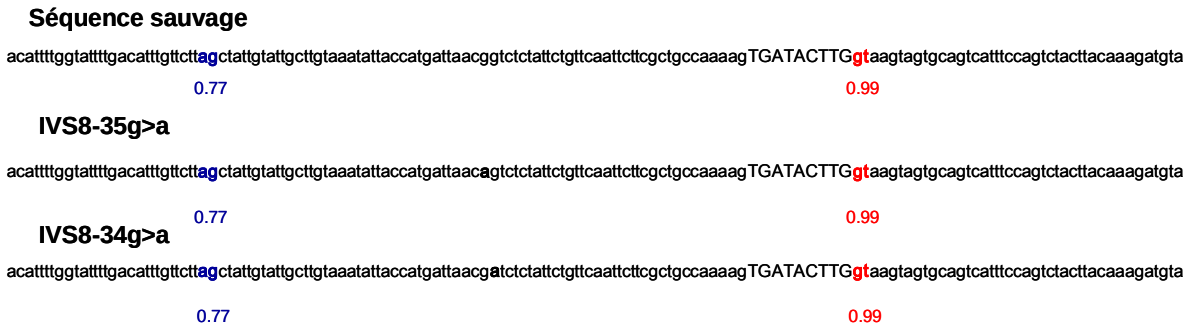


Figure 54 : Prédiction *in silico* des conséquences sur l'épissage des mutations de l'IVS 8 selon fruitfly.org. Site accepteur d'épissage en bleu, site donneur d'épissage en rouge. En gras, le nucléotide muté.

Au sein de la population contrôle, nous avons retrouvé la variation V334I chez 1 / 375 individus et la variation IVS8 -35G>A chez 1 / 375 individus soit une fréquence estimée à 0.3% pour chacune de ces variations au sein de la population témoin. Les variations IVS8-34 G>A, S311S (c.933c>T) et I333I (c.999C>T) n'ont jamais été identifiées chez 375 contrôles. Aucun contrôle n'avait 2 mutations.

Nous avons également trouvé des polymorphismes appelés SNV non rares (pour Single Nucleotide variation) déjà répertoriés à l'état hétérozygote ou homozygote. Comparativement à une population témoin caucasienne (HAPMAP), la fréquence des SNV chez les malades Kallmann et les témoins était comparable. Cette observation n'est pas en faveur d'un caractère pathogène de l'un d'entre eux.

ID	allèles	position	Fréquence du snv	Fréquence population témoin
rs 6650658	A/G	promoteur	**A/A : 0,92** **A/G : 0,08**	**A/A : 0,750** **A/G : 0,250**
rs 4458079	T/C	IVS4-58	**T/T : 0,88** **C/T : 0,12**	**T/T : 0,767** **C/T : 0,233**
rs 7237746	A/G	IVS5+105	**A/A : 0,98** **A/G : 0,02**	**A/A : 1**
rs 32161115	C/-	IVS8+31	**C/delC : 0,12**	**?**
rs 17557695	T/A	IVS11+60	**T/T : 0,54** **T/A : 0,42** **A/A : 0,04**	**T/T : 0,509** **T/A : 0,351** **A/A : 0,140**
rs 1617318	G/A	IVS16+14	**G/G: 0,46** **A/G: 0,44** **A/A: 0,1**	**G/G: 0,467** **A/G: 0,417** **A/A: 0,117**
rs 541157	T/C	IVS17+17	**T/T: 0,86** **C/T: 0,14**	**T/T: 0,712** **C/T: 0,220** **C/C: 0,068**
rs 2288085	A/G	IVS19	**A/A: 0,76** **A/G: 0,24**	**A/A: 0,583** **A/G: 0,350** **G/G: 0,067**

Tableau 17: Fréquence des SNV dans la population KS et chez les contrôles (HAPMAP).

VI Etude des mutations sur l'épissage de l'exon 9

Afin d'étudier les conséquences potentielles sur l'épissage de l'exon 9 de ces variations de séquence, nous avons construit un minigène (cf. Patients et méthodes chapitre II.9) comprenant la séquence génomique sauvage de l'exon 8 à l'exon 10 de l'alpha dystrobrévine ainsi que les séquences mutées dans le vecteur d'expression pcDNA3.1/V5His TOPO HA. Initialement, après la première série de séquençage de 120 patients Kallmann, nous avions identifié 2 variations de séquence chez une malade. Nous avons en conséquence crée 3 minigènes, le sauvage, V334I et IVS8-35 G>A.

Nous avons tout d'abord transfecté le minigène dans des cellules Hela et réalisé une PCR avec les amorces F-6 FAM et R spécifiques du vecteur (Figure 25). Il existe un épissage systématique de l'exon 9 y compris de la séquence sauvage rendant impossible l'évaluation des conséquences des variations sur l'épissage de l'exon 9 (Figure 55). Les lignées cellulaires possèdent des facteurs de régulation de leurs splicéosomes intrinsèques, dépendantes de leurs origines (Disset et al. 2005).

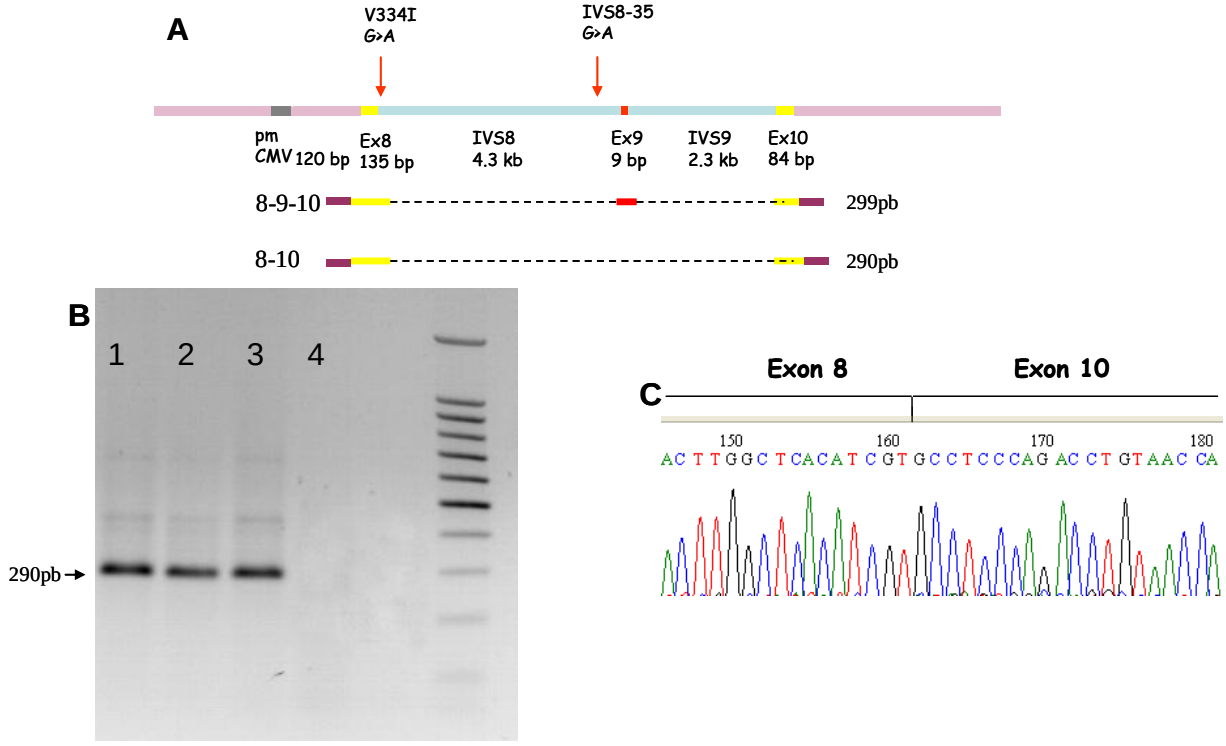


Figure 55 : Résultats de la transfection des minigènes sauvages, V334I et IVS8-35g>a dans les cellules HeLa.

A : Carte du minigène et des 2 transcrits potentiels contenant ou pas l'exon 9 (rouge). Les 2 mutations testées sont désignées par une flèche.

B : Electrophorèse en gel d'agarose 1% des produits PCR obtenus. 1 : minigène sauvage, 2 : minigène muté V334I, 3 : minigène contenant l'IVS8-35g>a, 4 : cellules non transfectées.

C : Electrophorégramme du fragment de la RTPCR.

Pour explorer les effets de ces variations, V334I, IVS8-35 G>A ainsi que celles retrouvées au cours de la 2ème série de patients, S311S (c.933c>T) et I333I (c.999C>T), au plus proche de notre modèle physiopathologique, nous avons transfecté les 5 minigènes (sauvage, V334I, S311S, I333I et IVS8-35 G>A) dans des lignées cellulaires dérivant de neuroblastomes murins, les Neuro2A, et réalisé une PCR avec les amorces décrites précédemment. Tous les minigènes ont généré 2 transcrits correspondant aux transcrits 8-9-10 (299pb) et 8-10 (290 pb) (Figure 56).

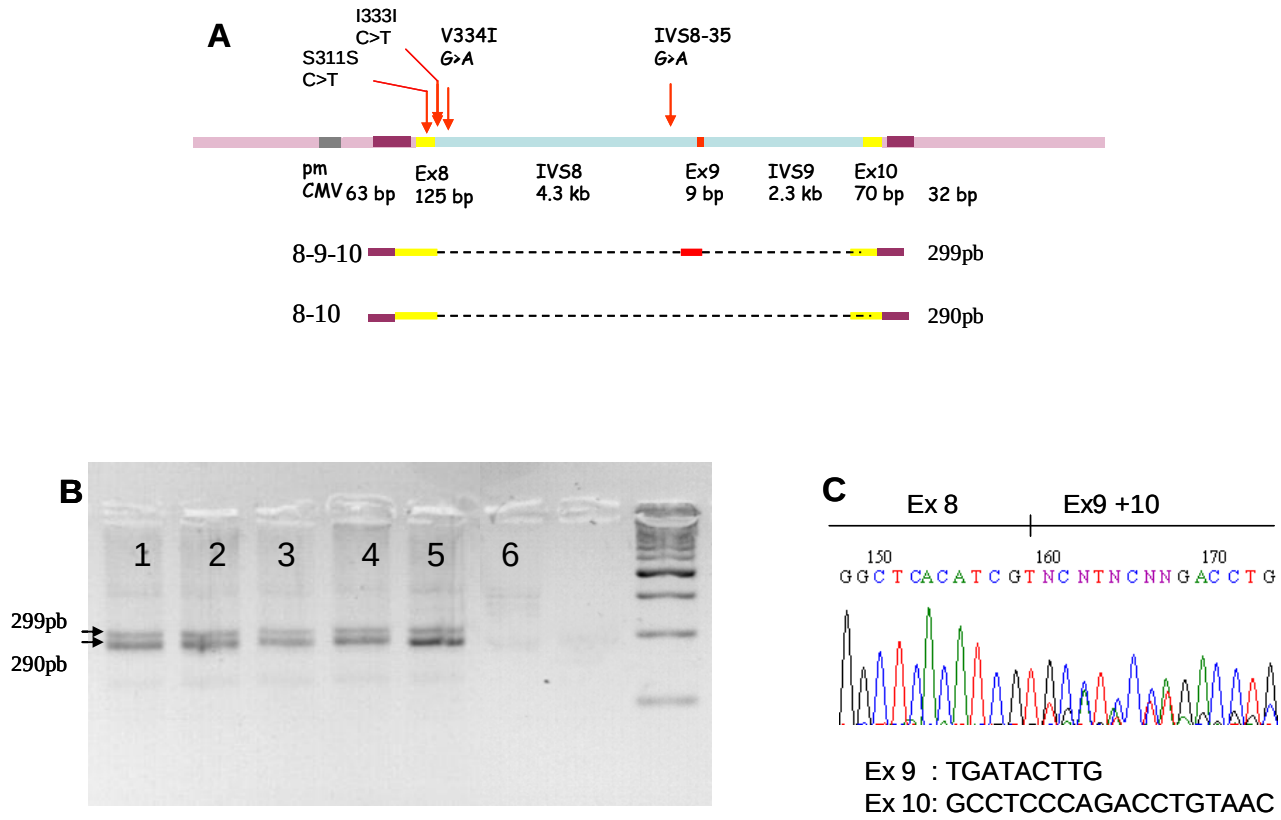


Figure 56 : Résultats de la transfection des minigènes sauvages et mutés dans les cellules Neuro2A.

A : Représentation du minigène et des 2 transcrits potentiels contenant ou pas l'exon 9 (rouge). Les 4 mutations testées sont désignées par une flèche.

B : Electrophorèse en gel Nusieve 12%, 1 : minigène sauvage, 2 : minigène muté V334I, 3 : minigène muté S311S, 4 : minigène muté I333I, 5 : minigène muté IVS8-35g>a, puit 6 : cellules non transfectées.

C : Electrophorégramme du fragment amplifié au sein des 5 puits, les séquences des exons 9 et 10 sont brouillées au sein des 5 puits, les 2 transcrits sont présents au sein des 5 puits.

Pour étudier la variation quantitative des transcrits 8-9-10 et 8-10, nous avons réalisé des PCR semiquantitatives, utilisant des amorces spécifiques du vecteur, où nous avons comparé le rapport de ces 2 isoformes. Trois transfections indépendantes ont été réalisées

et les RTPCR semi-quantitatives ont été faites en double ou triple pour chaque transfection (Figure 57). Les résultats sont résumés dans le Tableau 18 et la figure 58.

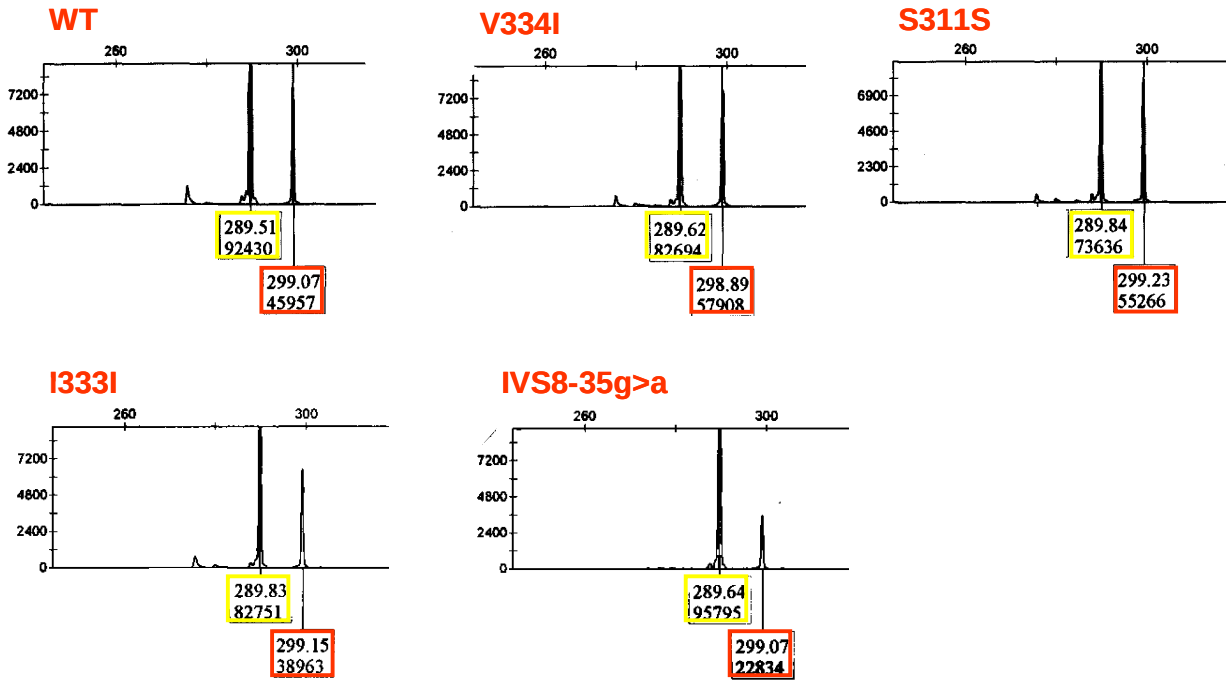


Figure 57 : Résultats d'une PCR semi-quantitative après transfection des 5 minigènes dans des cellules Neuro2A.
Résultats obtenus en PCR semiquantitative après transfection des 5 minigènes. L'échelle verticale représente l'intensité de fluorescence, l'échelle horizontale représente la taille des fragments obtenus à partir d'un standard. Les surfaces des pics correspondants aux transcrits courts sans exon 9 sont encadrées en jaune, celles contenant l'exon 9 en rouge.

Pour chaque analyse, nous avons considéré que la surface des 2 pics avec et sans exon 9 représente 100% des transcrits. Le % de chaque isoforme pour chaque mutant est représenté Figure 58.

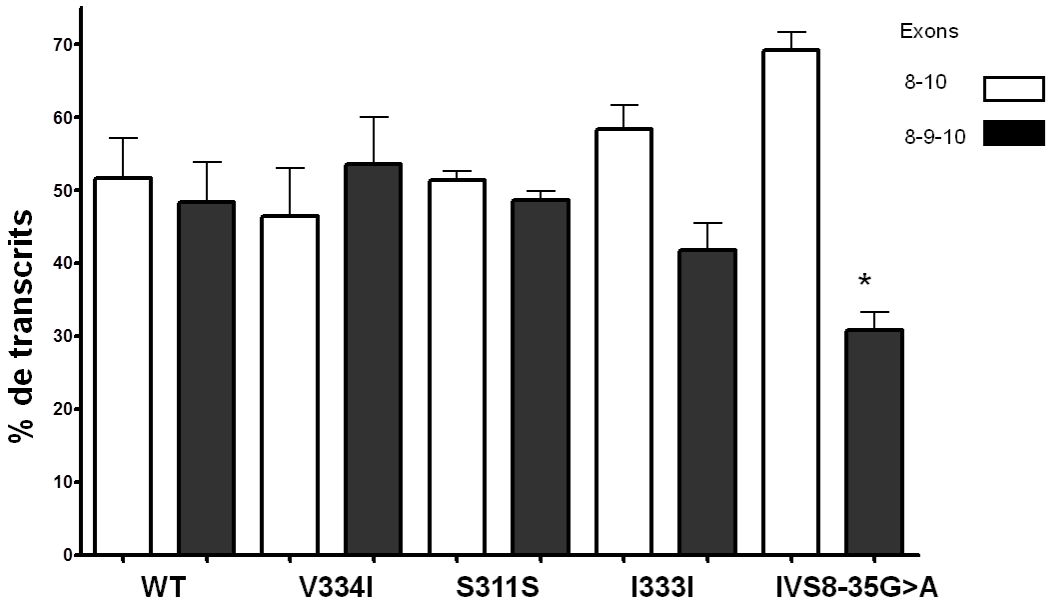


Figure 58: Représentation schématique de l'ensemble des résultats de PCR semi-quantitative après transfection de cellules Neuro2A.
La barre d'erreur correspond aux déviations standards. L'astérisque représente une diminution significative du taux de transcription de l'exon 9 entre le sauvage et l'IVS8-35g>a après une ANOVA suivie d'un test de Bonferroni.

Mutations	WT	V334I	S311S	I333I	IVS8-35g>a
Isoforme 8-9-10 (%) moyenne±DS	48.4±5.5	53.5±6.5	48.6±1.3	41.7±3.7	30.8±2.5
Isoforme 8-10 (%) moyenne±DS	51.6±5.5	46.5±6.5	51.4±1.3	58.3±3.7	69.2±2.5
Nb de transfection	5	5	3	3	5
Nb de PCR semiq	12	12	7	6	12

Tableau 18 : Proportion en moyenne de chacune des 2 isoformes après transfection de l'un des 5 minigènes. DS : déviation standard,

Les tests statistiques utilisés, ANOVA suivie du test de comparaison multiple de Bonferroni montrent que la diminution du taux de transcrits contenant l'exon 9 du minigène muté IVS8-35 G>A est statistiquement significative ($p<0.05$) mais ne l'est pas pour les mutations V334I, S311S et I333I.

Dans ces conditions expérimentales, nous n'avons pas obtenu de transcrit de taille anormale ce qui n'est pas en faveur de l'hypothèse de l'apparition d'un site cryptique d'épissage associé à l'inclusion de 35 bases supplémentaires comme nous le suggérait le programme in silico Human Splicing Finder.

VII Discussion

VII.1 Caractérisation d'un nouveau gène KS

La caractérisation de points de cassure d'une translocation chromosomique d'un patient est une méthode efficace pour identifier de nouveaux gènes responsables de maladie lorsque les méthodes d'analyse de liaison sont rendues difficiles. Ainsi des gènes ont été localisés ou identifiés grâce à des patients porteurs de translocation ; un gène responsable de KS, *WDR11* ainsi que des gènes d'autres maladies comme la dystrophie musculaire de Duchenne (Ray et al. 1985), le retard mental lié à l'X (Zemni et al. 2000), le syndrome BPES (Boccone et al. 1994; De Baere et al. 1999). En effet, un des points de cassure de la translocation peut interrompre un gène dont l'inactivation est responsable de la maladie ou éloigner le gène d'une séquence régulatrice de son expression (effet de position). Le caractère historiquement validé de cette méthode a fait de la délimitation des points de cassure d'une translocation chromosomique chez un patient KS une des méthodes de choix afin de caractériser de nouveaux gènes responsable de KS. Ces malades sont précieux car extrememement rares cependant l'association d'une translocation chromosomique et d'une maladie génétique peut être une coïncidence. En revanche, la comparaison de 2 populations de patients avec translocation chromosomique, l'une ayant un phénotype normal, l'autre un phénotype anormal, a permis d'établir que la présence de réarrangements complexes, impliquant plus de 2 points de cassure, n'était jamais retrouvé dans la population phénotypiquement normal (Baptista et al. 2008). Ainsi l'imputabilité d'un réarrangement complexe dans la physiopathogénie d'une maladie semble plus forte qu'en cas de translocation simple.

VII.2. L'implication de l'alpha dystrobrévine dans la pathogénie de KS

Nos résultats d'hybridation utilisant la technique FISH montrent qu'un seul gène, l'alpha dystrobrévine était interrompu par l'un des 4 points de cassure chromosomique trouvé chez ce patient KS. Aucune translocation impliquant le chromosome 18 n'a été décrite associée au KS jusqu'à maintenant. L'intérêt de l'implication de l'alpha dystrobrévine dans KS a été considérablement renforcé par la localisation de l'anosmie congénitale isolée dans cette même région chromosomique.

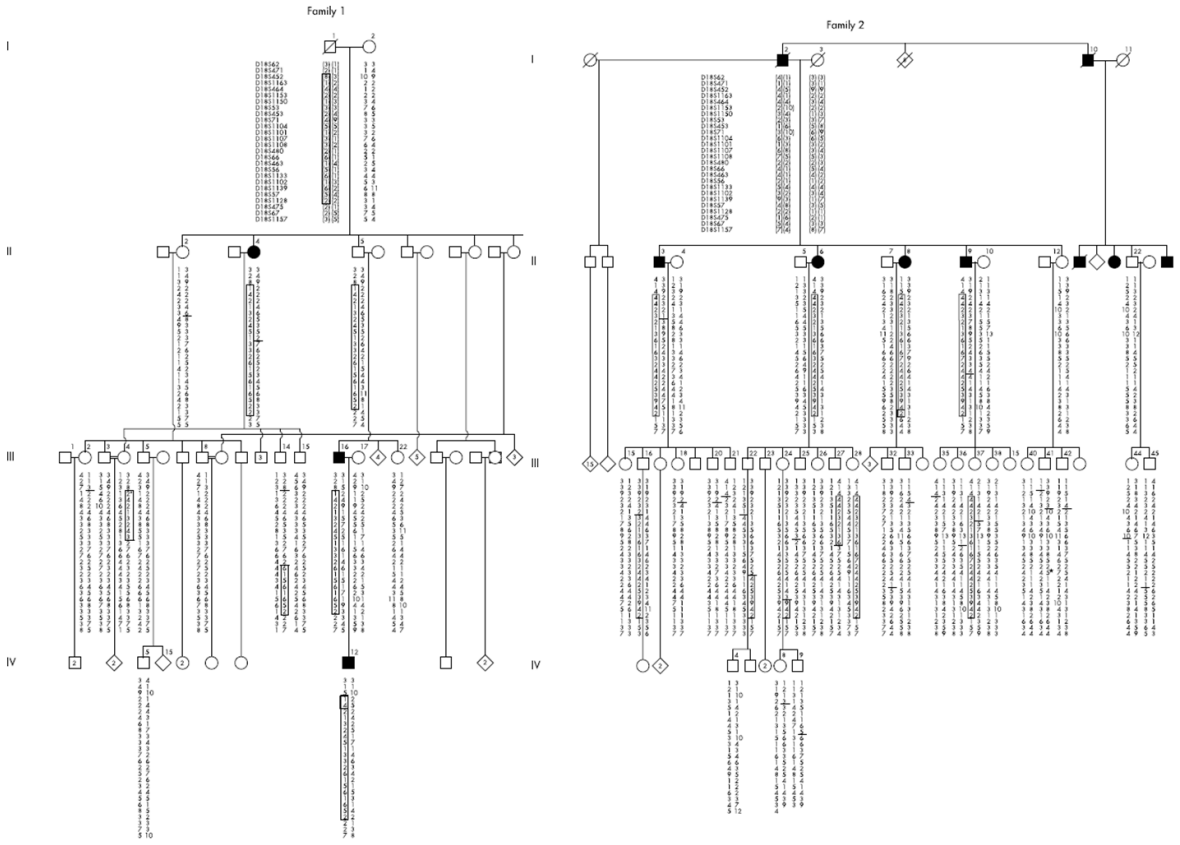


Figure 59: Arbres généalogiques des 2 familles ayant permis la localisation de l'anosmie congénitale isolée. D'après (Ghadami et al. 2004)

Les auteurs ont étudié 2 familles iraniennes non apparentées souffrant d'anosmie congénitale isolée, regroupant 3 sujets atteints sur 3 générations pour la première et 9 sujets atteints sur 2 générations, avec au total 54 membres étudiés (Figure 59). Ceci a permis de localiser une forme d'anosmie congénitale isolée de transmission autosomique dominante avec un intervalle de liaison entre les marqueurs D18S452 et D18S475 (lodscores supérieurs à 3) en 18p11.23-q12.2 (45.9 cM) (Figure 37). Ils ont effectué une recherche de mutation dans les parties codantes de 8 gènes candidats de l'intervalle *(GNAL, VAPA, PTPRM, PTPN2, CABYR, RNMT, CDH2 et NOL4.).* Aucune mutation n'a été mise en évidence chez les malades des 2 familles. A noter que des mutations de l'alpha dystrobrévine n'ont pas été recherchées. Nous nous sommes intéressés à l'anosmie congénitale isolée car il existe une pénétrance incomplète du KS dans de nombreuses familles porteuses de mutation dans *FGFR1*. En effet un malade KS trop rapidement considéré comme cas sporadique a très souvent l'un de ses parents atteints d'une anosmie ou d'une hyposmie sans hypogonadisme et porteurs de la même mutation (Dode et al. 2003). De plus il a été décrit dans des familles considérées atteintes d'anosmie congénitale isolée des cas de KS dans la descendance (Hockaday 1966). L'alpha dystrobrévine se situe

à l'intérieur de l'intervalle de l'anosmie congénitale ce qui renforce sa position de gène candidat responsable de KS.

Un autre élément impliquant le chromosome 18 dans la pathogénie du KS est la présence d'une arhinencéphalie (associée mécaniquement à une anomalie de migration des neurones à GnRH) chez les fœtus porteurs d'une trisomie 18 (Teixeira et al. 2010). Ainsi, il semble exister sur le chromosome 18, un ou des gènes impliqués dans la morphogénèse du bulbe olfactif qui, dysrégulés, seraient responsables d'une arhinencéphalie.

Enfin, grâce à l'amélioration des techniques de cytogénétique, des translocations apparemment équilibrées en cytogénétique conventionnelle pouvaient, en fait, être associées à des délétions dans 40 à 60% des cas (Baptista et al. 2008; De Gregori et al. 2007; Gribble et al. 2005). Ces délétions peuvent être associées aux points de cassure ou dans des régions non impliquées dans la translocation. En présence d'une délétion à distance du point de cassure chez un patient présentant un phénotype anormal, l'interprétation de la cause du phénotype (la délétion *vs* la translocation) est difficile et dépend des gènes impliqués dans ces 2 anomalies. De plus, il semblerait que ces délétions ne soient détectées en association à une translocation qu'en présence d'un phénotype anormal (Baptista et al. 2008) ce qui majore leur rôle pathogène potentiel. C'est pourquoi nous avons recherché des pertes ou gains de matériel chromosomique associés à cette translocation complexe chez notre patient KS. Nous les avons recherchés par une méthode de puces à ADN de comparaison d'hybridation sur laquelle 385000 sondes étaient présentes soit en moyenne une sonde/6kb. Malgré la grande résolution de cette méthode, je n'ai pas mis en évidence de pertes ou gains chromosomiques non référencés dans les bases de données témoins. Il ne semble donc pas qu'il existe chez ce patient des pertes ou gains associés à sa translocation.

Le rôle de l'alpha dystrobrévine est essentiellement connu dans le muscle où elle est associée au complexe dystrophine. Elle est cependant exprimée au niveau de nombreux tissus. Dans les cellules gliales de cerveau de rat, l'alpha dystrobrévine est exprimée, associée à l'isoforme Dp71 de la dystrophine et à la syntrophine (Blake et al. 1999) alors que dans les structures neuronales, le complexe est composé de la dystrophine, la béta dystrobrévine et la syntrophine. Un rôle du complexe dans le système nerveux central est aussi suggéré par la présence d'un déficit cognitif substantiel chez les patients porteurs d'une dystrophie musculaire de Duchenne (secondaire à des mutations de la dystrophine) de façon associée aux déficits musculaires progressifs cardiaques et squelettiques. De façon intéressante, l'isoforme Dp71 de la dystrophine, qui est associée à l'alpha dystrobrévine dans les cellules gliales, a été impliquée récemment dans la fasciculation du nerf voméronasal du système olfactif murin (Takatoh et al. 2008). En effet, il a été constaté que dans un modèle murin de KO des différentes isoformes de la dystrophine, les axones du

nerf voméronasal sont défasciculés. Seule l'isoforme Dp71 est exprimée dans le système olfactif murin (chez l'embryon et chez l'adulte). La Dp71 a été identifiée au sein des cellules engainantes olfactives dés E15.5 (1er stade exploré) colocalisant avec des protéines de la membrane extra cellulaire comme la laminine, la perlecan et des protéines du complexe associé à la dystrophine comme la béta-dystroglycane. La perte de Dp71 est responsable d'une diminution de l'expression de la béta-dystroglycane et de la perlecan à un niveau post-traductionnel, la perlecan étant une héparane sulfate protéoglycane qui pourrait intervenir dans l'interaction entre les axones des nerfs voméronasaux et les molécules de guidance axonale. On peut supposer que la diminution d'expression des isoformes cérébrales de l'alpha dystrobrévine puisse elle aussi entrainer une déstabilisation du complexe de protéines associé à la dystrophine au niveau du système olfactif et potentiellement la défasciculation du nerf voméronasal. Il faudrait regarder l'expression de Dp71 plus tôt au cours de l'embryogénèse murine entre E11.5 et E14 et si elle est exprimée dans les mêmes cellules que l'alpha dystrobrévine.

D'autre part, l'alpha dystrobrévine a comme partenaire indirect, via sa liaison à la syntrophine, une interaction avec la NOS neuronale. L'expression de la NOS neuronale a été étudiée au cours de l'embryogénèse chez le rat. Elle est exprimée dés E11 dans l'EO. Cette expression persiste à E12 (Figure 60) et apparait dans le BO à E15 (Roskams et al. 1994). Une étude de co-marquage alpha dystrobrévine/ NOS neuronale dans le système olfactif au cours de l'mebryogénèse murine serait nécessaire. Le rôle du NO a principalement été exploré dans la neurogénèse adulte où il a été identifié comme un facteur antiprolifératif. (Matarredona et al. 2005; Roskams et al. 1994).

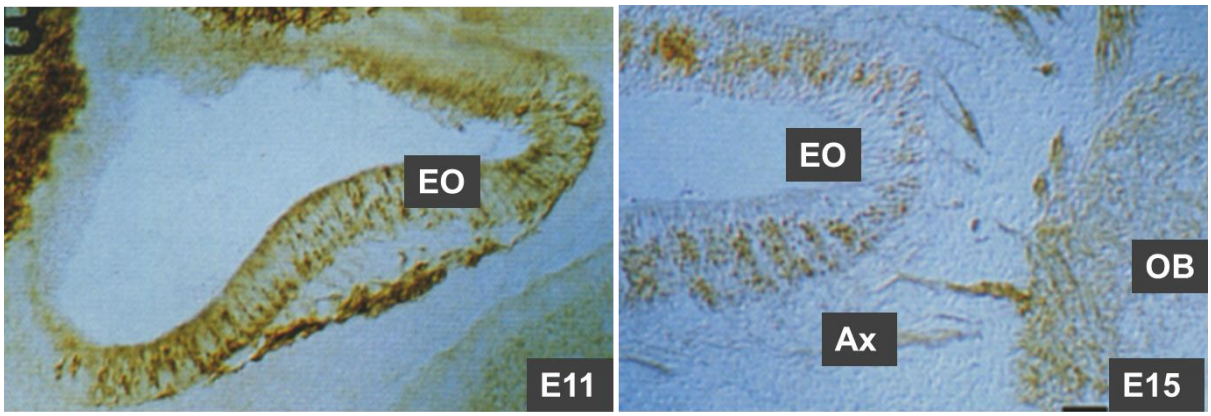


Figure 60: Etude de l'expression par immunohistochimie de la NOS neuronale au cours du développement du système olfactif de rat. Ax : Axones. D'après (Roskams et al. 1994).

Dés E11.5, l'alpha dystrobrévine est exprimée par certains neurones de l'EO et de l'organe voméronasal en formation, dans de la masse migratoire et par certains axones des nerfs

composant le nervus terminalis. Les neurones exprimant la GnRH suivent le trajet de ces nerfs de l'EO vers le BO (cf. Introduction Chapitre I.2.2).

Il n'existe pas de phénotype anormal chez la souris invalidée pour l'alpha dystrobrévine (délétion en N terminale ne permettant à aucune des isoformes de s'exprimer). Il n'y a pas eu d'étude précise du système olfactif de ces souris mais on peut supposer qu'il n'y a pas d'agénésie des BO puisque les nouveaux nés semblent survivre à un taux normal (l'absence d'odorat inhibe le réflexe de succion). Il peut cependant exister une architecture anormale du système olfactif comme observée chez la souris *Prok2*$^{-/-}$, qui permet une olfaction partielle (Ng et al. 2005). Des mécanismes de compensation peuvent différer entre ces 2 espèces. Une étude récente (Bohm et al. 2009) met en évidence des différences fonctionnelles fondamentales entre les formes humaines et murines d'alpha dystrobrévine particulièrement au sein des isoformes cérébrales dont la diversité est moitié moindre dans le cerveau murin adulte par rapport au cerveau humain. Il n'existe pas de données concernant les isoformes au cours de l'embryogénèse. Ces différences compliquent l'utilisation du modèle murin dans notre étude.

VII.3 Etude de la transcription des isoformes cérébrales mutées de l'alpha dystrobrévine

Nous avons identifié 5 variations de séquence différentes chez 3 patients KS, 1 variation faux sens retrouvée à 2 reprises (V334I), 2 variations synonymiques (I333I et S311S) et 2 variations introniques potentiellement responsables d'une altération de l'épissage (IVS8-34g>a et IVS8-35g>a). La fréquence de ces variations dans notre population est d'environ 0.9%.

L'absence des parents ne nous a pas permis la possibilité d'évaluer la ségrégation de ces variants avec le phénotype KS.

Les 5 variations de séquence identifiées chez nos 3 patients KS sont situées dans la partie terminale de l'exon 8 et dans l'IVS8 alors que l'exon 9 alternatif est très majoritairement exprimé au sein du cerveau (Figure.39). Le rôle de cet exon 9 n'est pas connu mais il était intéressant que ces 5 variations soient concentrées autour de ce seul exon. Cet exon 9 ne code que pour 3 acides aminés, DTW et l'intégration ou non de cet exon ne modifie pas la phase de la séquence de la protéine. Au niveau protéique, l'insertion de 3 acides aminés peut induire des conséquences structurales telles qu'un changement de conformation, la perte d'un site d'interaction protéique. A ce jour chez l'homme, 3 sites de liaison syntrophine ont été identifiés (Bohm et al. 2009), ils sont situés au niveau des régions codées par les exons 11, 13 et 14, les variations de séquence identifiées n'interviennent donc pas directement, *a priori*, avec la liaison syntrophine mais il est possible que le motif DTW ait un

rôle indirect dans cette liaison ou dans celle de la syntrophine à l'un de ses partenaires principal, la NOS neuronale.

Deux de ces variations (V334I et IVS8-35g>a) ont été identifiées dans notre population témoin à une fréquence estimée à 0.3% (2/750). La fréquence de ces variations dans la population KS (6/618) n'est pas significativement différente de celle dans la population témoin (2/750), p=0.1 au test exact de Fisher. Au décours des avancées sur le séquençage du génome humain, ces 5 variations ont été récemment référencées comme SNV (Tableau 19). Mais, la présence de variants alléliques de gènes responsables d'HH (normosmique et KS) au sein de la population générale a été récemment étudiée et est fréquente, 10% de la population générale pourrait avoir 1 variant identifié (Sykiotis et al. 2010).

Mutation	**Variation allélique**	**SNV ID**	**Source**	**Fréquence génotype hétérozygote dans la population témoin**
S311S	C/T	rs 114170541	ESP-cohort-population (4550 ch.)	0.019
I333I	C/T	rs 61737438	ESP-cohort-population (4548 ch.)	0.004
V334I	G/A	rs 148123045	ESP-cohort-population (4550 ch.)	0.002
IVS8-34G>A	A/G	rs 116547121	1000 genomes (118 ch.)	0.05
IVS8-35G>A	A/G	rs 114526733	1000 genomes (118 ch.)	0.033

Tableau 19: Références des 5 mutations identifiées chez les 3 patients KS. SNV, Single Nucleotide Variation ; rs, reference SNV ; ch., chromosome.

Par exemple, des mutations de *PROKR2* responsables de syndrome de Kallmann par un mode de transmission autosomique récessive ou oligogénique, dont la pathogénicité a été démontrée *in vitro* secondairement, ont été trouvées initialement à une fréquence de 4/500 dans la population témoin (Dode et al. 2006). D'autre part, la présence d'un variant modifiant l'épissage, anciennement dénommé polymorphisme, peut être associé à une maladie. Ainsi, la présence d'un variant dans l'exon 12 du gène du récepteur aux LDL (Low-density lipoproteins) qui majore l'épissage de cet exon est responsable d'une hypercholestérolémie chez les femmes pré-ménopausées. L'épissage de l'exon 12 génère une forme du récepteur résistante à l'internalisation. L'effet de ce variant est sexe-dépendant, un taux élevé d'estrogènes influencerait le niveau de transcription du gène ou son épissage alternatif (Zhu et al. 2007).

Chez 2/3 des patients porteurs de variations de séquence de l'alpha dystrobrévine, ces variations sont multiples (2 ou 3). Ces associations de variations de séquence ne sont jamais identifiées dans la population témoin ce qui est significativement moindre que dans la

population KS (2/318 vs 0/350, p<0.0001 au test exact de Fisher). De la même façon, dans la cohorte de déficit en GnRH où 10% de la population générale avait un variant identifié, aucun sujet témoin n'était porteur de plusieurs variants (Sykiotis et al. 2010).

L'identification d'un gène candidat par le biais d'une translocation chromosomique aurait pu évoquer une transmission autosomique dominante, un seul allèle du gène étant muté, ce que nous avons confirmé par l'absence de mutation de l'alpha dystrobrévine du patient transloqué. Mais, l'absence totale d'expression d'isoforme cérébrale dans le cas de la translocation peut être comparable à une diminution quantitative de certaines de celles-ci de façon secondaire à plusieurs variations de séquence.

Maintenant que la machinerie responsable de l''épissage, les rôles d'éléments introniques et exoniques ont été mieux définis, il est estimé que 50 à 60% des mutations responsables de maladie sont des mutations altérant l'épissage (Cartegni et al. 2002; Lopez-Bigas et al. 2005). En dehors des mutations touchant les sites consensus représentant 10% des mutations altérant l'épissage (Krawczak et al. 2007), l'épissage peut être altéré par différents types de mutations : des mutations ponctuelles introniques (ISE et ISS) ou exoniques (ESE et ESS), synonymiques ou non modifiant des régions régulatrices d'épissage, des mutations introniques ponctuelles créant un site cryptique d'épissage.

La meilleure approche pour déterminer si nos mutations d'intérêt ont un rôle sur l'épissage aurait été d'évaluer l'épissage de l'ARN endogène chez nos patients au sein du tissu d'intérêt ce qui est impossible. L'approche alternative est de comparer les ARNs et donc l'effet sur l'épissage, de minigènes porteurs ou non des mutations d'intérêt (Cooper 2005). Dans notre modèle cellulaire neuronale, nous avons pu démontrer que les variations de séquence identifiées I333I et IVS8-35G>A modifiaient le rapport entre 2 isoformes, l'une contenant l'exon 9 (exon 9+), l'autre ne contenant pas d'exon 9 (exon 9-). Il pourrait s'agir d'un effet tissu dépendant ce qui pourrait expliquer les symptômes exclusivement neuronaux des patients. Une étude récente du gène *CFTR* illustre cette hypothèse. Elle porte sur l'effet d'un polymorphisme de répétition sur l'épissage de l'exon en aval de ce polymorphisme, des différences significatives au sein de lignées cellulaires étaient objectivées. Des différences (quantitativement d'un tiers) pouvaient être observées en fonction de l'origine des cellules, que les cellules proviennent du testicule, du poumon, du colon ou du col utérin. De façon intéressante, le phénotype observé chez les malades concordait avec les anomalies d'épissage : les anomalies d'épissage étaient le plus importante au sein du tissu testiculaire et le phénotype principal de la maladie était l'infertilité (Disset et al. 2005). Nous nous sommes intéressés aux cellules Neuro2A car ce sont des lignées de neuroblastome murin « dites neuronales » qui nous paraissaient être la lignée la plus proche et disponible de notre modèle physiopathologique d'anomalie de migration des neurones à GnRH ou de connexion d'axones des nerfs olfactifs. Dans les perspectives de ce travail, il serait intéressant de

comprendre les mécanismes de régulation de cet exon 9 en cis ou en trans permettant d'appréhender la tissu spécificité.

Le promoteur intervient également sur l'efficacité de l'épissage alternatif d'un exon, il faudrait faire les mêmes expériences en changeant le promoteur CMV par celui de l'enolase 2 (ENO2) qui n'est exprimée que dans les neurones. En effet, des différences significatives des taux de transcrits obtenus ont été trouvées après transfection de minigènes possédant des promoteurs différents (Bolor et al. 2009). J'ai essayé de remplacer le promoteur CMV par le promoteur ENO2, je n'y suis pas arrivée car la construction est très grande (environ 12Kb) mais c'est envisageable.

D'autres maladies du système nerveux central sont causées par des changements de rapport entre 2 isoformes d'une protéine générées par un épissage alternatif. Ainsi, un défaut de la régulation de l'épissage de l'exon 10 du gène *MAPT (Microtubule Associated Protein Tau)* est responsable de démence fronto-temporale avec syndrome Parkinsonien (DFTP17). La protéine tau interagit avec les microtubules via des régions spécifiques dont l'une d'elle est codée par l'exon 10. L'inclusion de l'exon 10 crée une protéine avec 4 régions de liaisons aux microtubules, son exclusion, une protéine avec 3 régions de liaisons aux microtubules. Cet évènement est régulé selon les espèces et au cours du développement. Plusieurs mutations affectant l'épissage de cet exon 10 et affectant le rapport entre les 2 isoformes sont responsables de DFTP17 (Andreadis 2005; Hasegawa et al. 1999).

En revanche, pour la mutation IVS8-35g>a, nous n'avons pas retrouvé *in vitro* l'utilisation d'un nouveau site accepteur d'épissage prédit *in silico* par Human Splice Finder. Ces programmes sont utiles dans l'approche initiale des mutations suspectées d'être responsable d'un épissage aberrant mais pas utilisable dans le cas d'épissage alternatif tissu spécifique. Dans ces cas, la démonstration expérimentale est donc primordiale. On peut donc en conclure que, dans nos conditions expérimentales, la mutation IVS8-35g>a crée un pseudo site d'épissage.

Notre modèle d'étude n'a pas permis de démontrer d'effets sur l'épissage de l'exon 9 au sein d'une lignée cellulaire neuronale murine, des variations V334I et S311S, malgré la conservation des ces acides-aminés dans au cours de l'évolution. L'épissage alternatif est un phénomène dépendant de nombreux facteurs, la tissu-spécificité mais aussi le promoteur, des facteurs de régulation en trans espèces-spécifiques. La présence d'un promoteur ENO2 dans notre minigène aurait pu mettre en évidence une anomalie des transcrits indétectables avec le promoteur CMV. D'autre part, il s'agit de lignée cellulaire murine, il est possible qu'un facteur de régulation humain soit nécessaire aux effets de ces variations. De plus, en dehors de l'épissage de l'exon 9, ces variations pourraient altérer la fonction de l'alpha dystrobrévine d'une toute autre manière, la maturation et la stabilité de l'ARNm, la fonction protéique pour la variation non synonymique.

Enfin, des anomalies d'épissage concernant un exon de 3 acides aminés ont déjà été décrites dans le syndrome de Frasier. Ce syndrome est une maladie rare définie par un pseudo-hermaphrodisme masculin et une glomérulopathie progressive sans tumeur de Wilms'. Des mutations du gène des tumeurs de Wilms' sont responsables de différentes pathologies du système urogénital et ont été recherchées dans le syndrome de Frasier. Toutes les mutations identifiées de ce gène chez des patients ayant un syndrome de Frasier touchent une région de 9 paires de base codant pour un motif KTS, le rapport transcripts KTS+/KTS- est diminué dans les lymphocytes des patients ou via un minigène transfecté dans des cellules COS (Barbaux et al. 1997). L'haploinsuffisance de la forme KTS+ serait responsable d'altérations spécifique du développement rénal et la présence de la forme KTS- pourrait protéger ces patients de la formation de tumeur de Wilms'.

CONCLUSION et PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis dans une première partie, d'améliorer notre connaissance et la compréhension des formes génétiques de KS secondaires à des mutations *PROK2* ou *PROKR2*. Ainsi il a été confirmé dans une grande série de malades, que cette forme génétique n'est pas associée à des signes cliniques spécifiques. L'effet de ces mutations à l'état hétérozygote et homozygote sur la voie de signalisation PROKR2 ne parait pas jouer un rôle majeur sur le comportement alimentaire. L'augmentation chez nos patients mutés de chronotype du soir et de troubles du sommeil a motivé la réalisation, en cours, d'une étude sur le rythme circadien de patients mutés dans le service des pathologies du sommeil du Dr Arnulf. Il s'agit d'une actimétrie hebdomadaire associé à une mesure interne d'au moins 48 heures de la température corporelle. Nous avons confirmé le mode de transmission digénique chez des patients mutés *PROKR2* qui peut permettre d'appréhender une partie de la variabilité phénotypique. L'autre partie est sous la dépendance de facteurs environnementaux ou de mutations de gènes à identifier ce que suggère l'absence de mutation dans les 8 gènes KS chez plus de la majorité des patients. Nous avons mis en évidence une augmentation de la prévalence des mutations *PROKR2* chez nos patients Maghrébins. Cette augmentation pourrait être secondaire à un effet de pression de sélection positive dans cette population.

Dans une deuxième partie, par une approche cytogénétique, nous avons identifié chez un patient KS porteur d'une translocation complexe impliquant les chromosomes 3,13 et 18, l'alpha dystrobrévine comme un gène candidat de KS. L'alpha dystrobrévine est le seul gène interrompu dans cette translocation chromosomique et aucune délétion n'a été mise en évidence chez ce patient. Au cours de la translocation, la séquence codante est séparée spécifiquement du promoteur cérébral du gène. L'alpha dystrobrévine se situe sur le chromosome 18, au sein d'un locus lié à l'anosmie congénitale isolée, l'un des signes cliniques du KS. Elle est exprimée dans le système olfactif murin au cours de la migration des neurones synthétisant la GnRH1. Nous avons identifié 5 mutations différentes de l'alpha dystrobrévine chez 3 patients KS, toutes en amont de l'exon 9 du gène. Cet exon 9 est un exon alternatif exprimé quasi exclusivement au sein des isoformes cérébrales du gène. Notre modèle expérimental a permis de mettre en évidence des conséquences sur l'épissage de l'exon 9 pour 2 de ces mutations modifiant le rapport des 2 isoformes contenant et ne contenant pas les 3 acides aminés codés par l'exon 9. D'autres modèles expérimentaux doivent être testés pour les autres mutations. Nous souhaitons également mettre en évidence le rôle de la région codée par cet exon 9 afin de mieux appréhender la physiopathologie de l'implication de cette protéine dans le KS.

BIBLIOGRAPHIE

Abreu AP, Trarbach EB, de Castro M, Frade Costa EM, Versiani B, Matias Baptista MT, Garmes HM, Mendonca BB, Latronico AC. 2008. Loss-of-function mutations in the genes encoding prokineticin-2 or prokineticin receptor-2 cause autosomal recessive Kallmann syndrome. J Clin Endocrinol Metab 93(10):4113-4118.

Abujbara MA, Hamamy HA, Jarrah NS, Shegem NS, Ajlouni KM. 2004. Clinical and inheritance profiles of Kallmann syndrome in Jordan. Reprod Health 1(1):5.

Akutsu S, Takada M, Ohki-Hamazaki H, Murakami S, Arai Y. 1992. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in the chick embryo: effect of the olfactory placode ablation. Neurosci Lett 142(2):241-244.

Albrecht DE, Froehner SC. 2004. DAMAGE, a novel alpha-dystrobrevin-associated MAGE protein in dystrophin complexes. J Biol Chem 279(8):7014-7023.

Albuisson J, Pêcheux C, Carel J-C, Lacombe D, Leheup B, Lapuzina P, Bouchard P, Legius E, Matthijs G, Wasniewska M, Delpech M, Young J, Hardelin J-P, Dodé C. 2005. Kallmann syndrome: 14 novel mutations in KAL1 and FGFR1 (KAL2). Hum Mutat 25(1):98-99.

Allison AC. 1954. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malareal infection. Br Med J 1(4857):290-294.

Amoss M, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemin R. 1971. Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. Biochem Biophys Res Commun 44(1):205-210.

Andreadis A. 2005. Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. Biochim Biophys Acta 1739(2-3):91-103.

Arai Y, Murakami S, Seki T. 1994. Removal of olfactory placode prevents the development of LHRH neurons in the forebrain of the chick embryo: possible interaction between migrating LHRH neurons and highly polysialylated form of neural cell adhesion molecule (NCAM-H). Acta Biol Hung 45(2-4):155-168.

Arauz RF, Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, Gropman AL, Parsons JA, Roessler E, Muenke M. 2010. A Hypomorphic Allele in the FGF8 Gene Contributes to Holoprosencephaly and Is Allelic to Gonadotropin-Releasing Hormone Deficiency in Humans. Mol Syndromol 1(2):59-66.

Badano JL, Katsanis N. 2002. Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission. Nat Rev Genet 3(10):779-789.

Bailleul-Forestier I, Gros C, Zenaty D, Bennaceur S, Leger J, de Roux N. 2010. Dental agenesis in Kallmann syndrome individuals with FGFR1 mutations. Int J Paediatr Dent 20(4):305-312.

Balasubramanian S, Fung ET, Huganir RL. 1998. Characterization of the tyrosine phosphorylation and distribution of dystrobrevin isoforms. FEBS Lett 432(3):133-140.

Balmer CW, LaMantia AS. 2005. Noses and neurons: induction, morphogenesis, and neuronal differentiation in the peripheral olfactory pathway. Dev Dyn 234(3):464-481.

Baptista J, Mercer C, Prigmore E, Gribble SM, Carter NP, Maloney V, Thomas NS, Jacobs PA, Crolla JA. 2008. Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. Am J Hum Genet 82(4):927-936.

Barbaux S, Niaudet P, Gubler MC, Grunfeld JP, Jaubert F, Kuttenn F, Fekete CN, Souleyreau-Therville N, Thibaud E, Fellous M, McElreavey K. 1997. Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. Nat Genet 17(4):467-470.

Battersby S, Critchley HO, Morgan K, Millar RP, Jabbour HN. 2004. Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 89(5):2463-2469.

Bauman A. 1986. Markedly delayed puberty or Kallmann's syndrome variant. J Androl 7(4):224-227.

Bedecarrats GY, Linher KD, Kaiser UB. 2003. Two common naturally occurring mutations in the human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor have differential effects on gonadotropin gene expression and on GnRH-mediated signal transduction. J Clin Endocrinol Metab 88(2):834-843.

Benson MA, Newey SE, Martin-Rendon E, Hawkes R, Blake DJ. 2001. Dysbindin, a novel coiled-coil-containing protein that interacts with the dystrobrevins in muscle and brain. J Biol Chem 276(26):24232-24241.

Benton JL, Sandeman DC, Beltz BS. 2007. Nitric oxide in the crustacean brain: regulation of neurogenesis and morphogenesis in the developing olfactory pathway. Dev Dyn 236(11):3047-3060.

Bergman JE, Bocca G, Hoefsloot LH, Meiners LC, van Ravenswaaij-Arts CM. 2011a. Anosmia predicts hypogonadotropic hypogonadism in CHARGE syndrome. J Pediatr 158(3):474-479.

Bergman JE, de Ronde W, Jongmans MC, Wolffenbuttel BH, Drop SL, Hermus A, Bocca G, Hoefsloot LH, van Ravenswaaij-Arts CM. 2012. The Results of CHD7 Analysis in Clinically Well-Characterized Patients with Kallmann Syndrome. J Clin Endocrinol Metab 97(5):E858-862.

Bergman JE, Janssen N, Hoefsloot LH, Jongmans MC, Hofstra RM, van Ravenswaaij-Arts CM. 2011b. CHD7 mutations and CHARGE syndrome: the clinical implications of an expanding phenotype. J Med Genet 48(5):334-342.

Bicker G. 2005. STOP and GO with NO: nitric oxide as a regulator of cell motility in simple brains. Bioessays 27(5):495-505.

Blake DJ, Hawkes R, Benson MA, Beesley PW. 1999. Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. J Cell Biol 147(3):645-658.

Blake DJ, Nawrotzki R, Peters MF, Froehner SC, Davies KE. 1996. Isoform diversity of dystrobrevin, the murine 87-kDa postsynaptic protein. J Biol Chem 271(13):7802-7810.

Blake KD, Davenport SL, Hall BD, Hefner MA, Pagon RA, Williams MS, Lin AE, Graham JM, Jr. 1998. CHARGE association: an update and review for the primary pediatrician. Clin Pediatr (Phila) 37(3):159-173.

Blustajn J, Kirsch CF, Panigrahy A, Netchine I. 2008. Olfactory anomalies in CHARGE syndrome: imaging findings of a potential major diagnostic criterion. AJNR Am J Neuroradiol 29(7):1266-1269.

Boas FE. 2000. Linkage to Gaucher mutations in the Ashkenazi population: effect of drift on decay of linkage disequilibrium and evidence for heterozygote selection. Blood Cells Mol Dis 26(4):348-359.

Boccone L, Meloni A, Falchi AM, Usai V, Cao A. 1994. Blepharophimosis, ptosis, epicanthus inversus syndrome, a new case associated with de novo balanced autosomal translocation [46,XY,t(3;7)(q23;q32)]. Am J Med Genet 51(3):258-259.

Bohm SV, Constantinou P, Tan S, Jin H, Roberts RG. 2009. Profound human/mouse differences in alpha-dystrobrevin isoforms: a novel syntrophin-binding site and promoter missing in mouse and rat. BMC Biol 7:85.

Bolor H, Mori T, Nishiyama S, Ito Y, Hosoba E, Inagaki H, Kogo H, Ohye T, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Nishizawa H, Pryor-Koishi K, Kitaoka E, Sawada T, Nishiyama Y, Udagawa Y, Kurahashi H. 2009. Mutations of the SYCP3 gene in women with recurrent pregnancy loss. Am J Hum Genet 84(1):14-20.

Bouvattier C, Maione L, Bouligand J, Dode C, Guiochon-Mantel A, Young J. 2011. Neonatal gonadotropin therapy in male congenital hypogonadotropic hypogonadism. Nat Rev Endocrinol 8(3):172-182.

Bragg AD, Das SS, Froehner SC. 2010. Dystrophin-associated protein scaffolding in brain requires alpha-dystrobrevin. Neuroreport 21(10):695-699.

Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Bredt DS. 1996. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. Cell 84(5):757-767.

Brioude F, Bouligand J, Trabado S, Francou B, Salenave S, Kamenicky P, Brailly-Tabard S, Chanson P, Guiochon-Mantel A, Young J. 2010. Non-syndromic congenital hypogonadotropic hypogonadism: clinical presentation and genotype-phenotype relationships. Eur J Endocrinol 162(5):835-851.

Bruder CE, Piotrowski A, Gijsbers AA, Andersson R, Erickson S, Diaz de Stahl T, Menzel U, Sandgren J, von Tell D, Poplawski A, Crowley M, Crasto C, Partridge EC, Tiwari H, Allison DB, Komorowski J, van Ommen GJ, Boomsma DI, Pedersen NL, den Dunnen JT, Wirdefeldt K, Dumanski JP. 2008. Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles. Am J Hum Genet 82(3):763-771.

Bullock CM, Li JD, Zhou QY. 2004. Structural determinants required for the bioactivities of prokineticins and identification of prokineticin receptor antagonists. Mol Pharmacol 65(3):582-588.

Bulow HE, Berry KL, Topper LH, Peles E, Hobert O. 2002. Heparan sulfate proteoglycan-dependent induction of axon branching and axon misrouting by the Kallmann syndrome gene kal-1. Proc Natl Acad Sci U S A 99(9):6346-6351.

Bulow HE, Hobert O. 2004. Differential sulfations and epimerization define heparan sulfate specificity in nervous system development. Neuron 41(5):723-736.

Buysse DJ, Reynolds CF, 3rd, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. 1989. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. Psychiatry Res 28(2):193-213.

Caronia LM, Martin C, Welt CK, Sykiotis GP, Quinton R, Thambundit A, Avbelj M, Dhruvakumar S, Plummer L, Hughes VA, Seminara SB, Boepple PA, Sidis Y, Crowley WF, Jr., Martin KA, Hall JE, Pitteloud N. 2011. A genetic basis for functional hypothalamic amenorrhea. N Engl J Med 364(3):215-225.

Carr VM, Farbman AI. 1992. Ablation of the olfactory bulb up-regulates the rate of neurogenesis and induces precocious cell death in olfactory epithelium. Exp Neurol 115(1):55-59.

Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. Nat Rev Genet 3(4):285-298.

Catalano RD, Lannagan TR, Gorowiec M, Denison FC, Norman JE, Jabbour HN. 2010. Prokineticins: novel mediators of inflammatory and contractile pathways at parturition? Mol Hum Reprod 16(5):311-319.

Chaabouni-Bouhamed H. 2008. Tunisia: communities and community genetics. Community Genet 11(6):313-323.

Chalouhi C, Faulcon P, Le Bihan C, Hertz-Pannier L, Bonfils P, Abadie V. 2005. Olfactory evaluation in children: application to the CHARGE syndrome. Pediatrics 116(1):e81-88.

Chan YM, de Guillebon A, Lang-Muritano M, Plummer L, Cerrato F, Tsiaras S, Gaspert A, Lavoie HB, Wu CH, Crowley WF, Jr., Amory JK, Pitteloud N, Seminara SB. 2009. GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. Proc Natl Acad Sci U S A 106(28):11703-11708.

Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM, Zhou QY. 2002. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. Nature 417(6887):405-410.

Chung WC, Moyle SS, Tsai PS. 2008. Fibroblast growth factor 8 signaling through fibroblast growth factor receptor 1 is required for the emergence of gonadotropin-releasing hormone neurons. Endocrinology 149(10):4997-5003.

Cole LW, Sidis Y, Zhang C, Quinton R, Plummer L, Pignatelli D, Hughes VA, Dwyer AA, Raivio T, Hayes FJ, Seminara SB, Huot C, Alos N, Speiser P, Takeshita A, Van Vliet G, Pearce S, Crowley WF, Jr., Zhou QY, Pitteloud N. 2008. Mutations in prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 genes in human gonadotrophin-releasing hormone deficiency: molecular genetics and clinical spectrum. J Clin Endocrinol Metab 93(9):3551-3559.

Conzelmann S, Levai O, Breer H, Strotmann J. 2002. Extraepithelial cells expressing distinct olfactory receptors are associated with axons of sensory cells with the same receptor type. Cell Tissue Res 307(3):293-301.

Cooper TA. 2005. Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements. Methods 37(4):331-340.

Coutant R, Biette-Demeneix E, Bouvattier C, Bouhours-Nouet N, Gatelais F, Dufresne S, Rouleau S, Lahlou N. 2010. Baseline inhibin B and anti-Mullerian hormone measurements for diagnosis of hypogonadotropic hypogonadism (HH) in boys with delayed puberty. J Clin Endocrinol Metab 95(12):5225-5232.

De Baere E, Van Roy N, Speleman F, Fukushima Y, De Paepe A, Messiaen L. 1999. Closing in on the BPES gene on 3q23: mapping of a de Novo reciprocal translocation t(3;4)(q23;p15.2) breakpoint within a 45-kb cosmid and mapping of three candidate genes, RBP1, RBP2, and beta'-COP, distal to the breakpoint. Genomics 57(1):70-78.

De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, Novara F, Vetro A, Rossi E, Maraschio P, Bonaglia MC, Anichini C, Ferrero GB, Silengo M, Fazzi E, Zatterale A, Fischetto R, Previdere C, Belli S, Turci A, Calabrese G, Bernardi F, Meneghelli E, Riegel M, Rocchi M, Guerneri S, Lalatta F, Zelante L, Romano C, Fichera M, Mattina T, Arrigo G, Zollino M, Giglio S, Lonardo F, Bonfante A, Ferlini A, Cifuentes F, Van Esch H, Backx L, Schinzel A, Vermeesch JR, Zuffardi O. 2007. Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. J Med Genet 44(12):750-762.

de Morsier G. 1954. Etudes sur les dysraphies crânio-encéphaliques. 1. Agénésie des lobes olfactifs (telencephaloschizis latéral) et des commissures calleuse et antérieure (telencephaloschizis médian). La dysplasie olfacto-génitale. Schweiz Arch Neurol Psychiat 74:309-361.

de Morsier G. 1962. Median cranioencephalic dysraphias and olfactogenital dysplasia. World Neurol 3:485.

de Morsier G, Gauthier G. 1963. La dysplasie olfacto-génitale. Pathol Biol 11:1267-1272.

de Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, Chanson P, Schaison G, Milgrom E. 1997. A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. N Engl J Med 337(22):1597-1602.

Delahaye A, Sznajer Y, Lyonnet S, Elmaleh-Berges M, Delpierre I, Audollent S, Wiener-Vacher S, Mansbach AL, Amiel J, Baumann C, Bremond-Gignac D, Attie-Bitach T, Verloes A, Sanlaville D. 2007. Familial CHARGE syndrome because of CHD7 mutation: clinical intra- and interfamilial variability. Clin Genet 72(2):112-121.

Denison FC, Battersby S, King AE, Szuber M, Jabbour HN. 2008. Prokineticin-1: a novel mediator of the inflammatory response in third-trimester human placenta. Endocrinology 149(7):3470-3477.

Depienne C, Bouteiller D, Meneret A, Billot S, Groppa S, Klebe S, Charbonnier-Beaupel F, Corvol JC, Saraiva JP, Brueggemann N, Bhatia K, Cincotta M, Brochard V, Flamand-Roze C, Carpentier W, Meunier S, Marie Y, Gaussen M, Stevanin G, Wehrle R, Vidailhet M, Klein C, Dusart I, Brice A, Roze E. 2012. RAD51 haploinsufficiency causes congenital mirror movements in humans. Am J Hum Genet 90(2):301-307.

Disset A, Michot C, Harris A, Buratti E, Claustres M, Tuffery-Giraud S. 2005. A T3 allele in the CFTR gene exacerbates exon 9 skipping in vas deferens and epididymal cell lines and is associated with Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens (CBAVD). Hum Mutat 25(1):72-81.

Dodé C, Fouveaut C, Mortier G, Janssens S, Bertherat J, Mahoudeau J, Kottler M-L, Chabrolle C, Gancel A, Francois I, Devriendt K, Wolczynski S, Pugeat M, Pineiro-Garcia A, Murat A, Bouchard P, Young J, Delpech M, Hardelin J-P. 2007. Novel FGFR1 sequence variants in Kallmann syndrome, and genetic evidence that the FGFR1c isoform is required in olfactory bulb and palate morphogenesis. Hum Mutat 28(1):97-98.

Dodé C, Levilliers J, Dupont J-M, De Paepe A, Le Du N, Soussi-Yanicostas N, Coimbra RS, Delmaghani S, Compain-Nouaille S, Baverel F, Pecheux C, Le Tessier D, Cruaud C, Delpech M, Speleman F, Vermeulen S, Amalfitano A, Bachelot Y, Bouchard P, Cabrol S, Carel J-C, Delemarre-van de Waal H, Goulet-Salmon B, Kottler M-L, Richard O, Sanchez-Franco F, Saura R, Young J, Petit C, Hardelin J-P. 2003. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. Nat Genet 33(4):463-465.

Dode C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Du N, Soussi-Yanicostas N, Coimbra RS, Delmaghani S, Compain-Nouaille S, Baverel F, Pecheux C, Le Tessier D, Cruaud C, Delpech M, Speleman F, Vermeulen S, Amalfitano A, Bachelot Y, Bouchard P, Cabrol S, Carel JC, Delemarre-van de Waal H, Goulet-Salmon B, Kottler ML, Richard O, Sanchez-Franco F, Saura R, Young J, Petit C, Hardelin JP. 2003. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. Nat Genet 33(4):463-465.

Dode C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler ML, Lespinasse J, Lienhardt-Roussie A, Mathieu M, Moerman A, Morgan G, Murat A, Toublanc JE, Wolczynski S, Delpech M, Petit C, Young J, Hardelin JP. 2006. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. PLoS Genet 2(10):e175.

Duke V, Quinton R, Gordon I, Bouloux PM, Woolf AS. 1998. Proteinuria, hypertension and chronic renal failure in X-linked Kallmann's syndrome, a defined genetic cause of solitary functioning kidney. Nephrol Dial Transplant 13(8):1998-2003.

Eloit C, Trotier D. 1994. A new clinical olfactory test to quantify olfactory deficiencies. Rhinology 32(2):57-61.

Engelen E, Akinci U, Bryne JC, Hou J, Gontan C, Moen M, Szumska D, Kockx C, van Ijcken W, Dekkers DH, Demmers J, Rijkers EJ, Bhattacharya S, Philipsen S, Pevny LH, Grosveld FG, Rottier RJ, Lenhard B, Poot RA. 2011. Sox2 cooperates with Chd7 to regulate genes that are mutated in human syndromes. Nat Genet 43(6):607-611.

Falardeau J, Chung WC, Beenken A, Raivio T, Plummer L, Sidis Y, Jacobson-Dickman EE, Eliseenkova AV, Ma J, Dwyer A, Quinton R, Na S, Hall JE, Huot C, Alois N, Pearce SH, Cole LW, Hughes V, Mohammadi M, Tsai P, Pitteloud N. 2008. Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. J Clin Invest 118(8):2822-2831.

Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, Giordano T, Peale F. 2003. Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. Am J Pathol 162(6):1881-1893.

Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M. 2005. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. Proc Natl Acad Sci U S A 102(30):10604-10609.

Franco B, Guioli S, Pragliola A, Incerti B, Bardoni B, Tonlorenzi R, Carrozzo R, Maestrini E, Pieretti M, Taillon-Miller P, Brown CJ, Willard HF, Lawrence C, Graziella Persico M, Camerino G, Ballabio A. 1991. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. Nature 353(6344):529-536.

Fromantin M, Gineste J, Didier A, Rouvier J. 1973. [Impuberism and hypogonadism at induction into military service. Statistical study]. Probl Actuels Endocrinol Nutr 16:179-199.

Gardiner JV, Bataveljic A, Patel NA, Bewick GA, Roy D, Campbell D, Greenwood HC, Murphy KG, Hameed S, Jethwa PH, Ebling FJ, Vickers SP, Cheetham S, Ghatei MA, Bloom SR, Dhillo WS. 2009. Prokineticin 2 is a hypothalamic neuropeptide that potently inhibits food intake. Diabetes 59(2):397-406.

Gee SH, Madhavan R, Levinson SR, Caldwell JH, Sealock R, Froehner SC. 1998. Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. J Neurosci 18(1):128-137.

Ghadami M, Morovvati S, Majidzadeh AK, Damavandi E, Nishimura G, Kinoshita A, Pasalar P, Komatsu K, Najafi MT, Niikawa N, Yoshiura K. 2004. Isolated congenital anosmia locus maps to 18p11.23-q12.2. J Med Genet 41(4):299-303.

Gibbs SM. 2003. Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide. Mol Neurobiol 27(2):107-120.

Gong Q, Shipley MT. 1995. Evidence that pioneer olfactory axons regulate telencephalon cell cycle kinetics to induce the formation of the olfactory bulb. Neuron 14(1):91-101.

Gonzalez-Martinez D, Kim SH, Hu Y, Guimond S, Schofield J, Winyard P, Vannelli GB, Turnbull J, Bouloux PM. 2004. Anosmin-1 modulates fibroblast growth factor receptor 1 signaling in human gonadotropin-releasing hormone olfactory neuroblasts through a heparan sulfate-dependent mechanism. J Neurosci 24(46):10384-10392.

Gorowiec MR, Catalano RD, Norman JE, Denison FC, Jabbour HN. Prokineticin 1 induces inflammatory response in human myometrium: a potential role in initiating term and preterm parturition. Am J Pathol 179(6):2709-2719.

Gorowiec MR, Catalano RD, Norman JE, Denison FC, Jabbour HN. 2011. Prokineticin 1 induces inflammatory response in human myometrium: a potential role in initiating term and preterm parturition. Am J Pathol 179(6):2709-2719.

Grady RM, Grange RW, Lau KS, Maimone MM, Nichol MC, Stull JT, Sanes JR. 1999. Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. Nat Cell Biol 1(4):215-220.

Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ng BL, Douglas EJ, Fiegler H, Carr P, Kalaitzopoulos D, Clegg S, Sandstrom R, Temple IK, Youings SA, Thomas NS, Dennis NR, Jacobs PA, Crolla JA, Carter NP. 2005. The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. J Med Genet 42(1):8-16.

Grumbach MM. 2005. A window of opportunity: the diagnosis of gonadotropin deficiency in the male infant. J Clin Endocrinol Metab 90(5):3122-3127.

Hardelin J-P, Levilliers J, Blanchard S, Carel J-C, Leutenegger M, Pinard-Bertelletto J-P, Bouloux P, Petit C. 1993. Heterogeneity in the mutations responsible for X chromosome-linked Kallmann syndrome. Hum Mol Genet 2:373-377.

Hardelin JP, Julliard AK, Moniot B, Soussi-Yanicostas N, Verney C, Schwanzel-Fukuda M, Ayer-Le Lievre C, Petit C. 1999. Anosmin-1 is a regionally restricted component of basement membranes and interstitial matrices during organogenesis: implications for the developmental anomalies of X chromosome-linked Kallmann syndrome. Dev Dyn 215(1):26-44.

Hasegawa M, Smith MJ, Iijima M, Tabira T, Goedert M. 1999. FTDP-17 mutations N279K and S305N in tau produce increased splicing of exon 10. FEBS Lett 443(2):93-96.

Hebert JM, Lin M, Partanen J, Rossant J, McConnell SK. 2003. FGF signaling through FGFR1 is required for olfactory bulb morphogenesis. Development 130(6):1101-1111.

Hermanussen M, Sippell WG. 1985. Heterogeneity of Kallmann's syndrome. Clin Genet 28(2):106-111.

Hipkin LJ, Casson IF, Davis JC. 1990. Identical twins discordant for Kallmann's syndrome. J Med Genet 27(3):198-199.

Hockaday TD. 1966. Hypogonadism and life-long anosmia. Postgrad Med J 42(491):572-574.

Horne JA, Ostberg O. 1976. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. Int J Chronobiol 4(2):97-110.

Ichida F, Tsubata S, Bowles KR, Haneda N, Uese K, Miyawaki T, Dreyer WJ, Messina J, Li H, Bowles NE, Towbin JA. 2001. Novel gene mutations in patients with left ventricular noncompaction or Barth syndrome. Circulation 103(9):1256-1263.

Izvolsky KI, Lu J, Martin G, Albrecht KH, Cardoso WV. 2008. Systemic inactivation of Hs6st1 in mice is associated with late postnatal mortality without major defects in organogenesis. Genesis 46(1):8-18.

Jimenez D, Garcia C, de Castro F, Chedotal A, Sotelo C, de Carlos JA, Valverde F, Lopez-Mascaraque L. 2000. Evidence for intrinsic development of olfactory structures in Pax-6 mutant mice. J Comp Neurol 428(3):511-526.

Jones JR, Kemmann E. 1976. Olfacto-genital dysplasia in the female. Obstet Gynecol Annu 5:443-466.

Jongmans MC, Admiraal RJ, van der Donk KP, Vissers LE, Baas AF, Kapusta L, van Hagen JM, Donnai D, de Ravel TJ, Veltman JA, Geurts van Kessel A, De Vries BB, Brunner HG, Hoefsloot LH, van Ravenswaaij CM. 2006. CHARGE syndrome: the phenotypic spectrum of mutations in the CHD7 gene. J Med Genet 43(4):306-314.

Jongmans MC, Hoefsloot LH, van der Donk KP, Admiraal RJ, Magee A, van de Laar I, Hendriks Y, Verheij JB, Walpole I, Brunner HG, van Ravenswaaij CM. 2008. Familial CHARGE syndrome and the CHD7 gene: a recurrent missense mutation, intrafamilial recurrence and variability. Am J Med Genet A 146A(1):43-50.

Jongmans MC, van Ravenswaaij-Arts CM, Pitteloud N, Ogata T, Sato N, Claahsen-van der Grinten HL, van der Donk K, Seminara S, Bergman JE, Brunner HG, Crowley WF,

Jr., Hoefsloot LH. 2009. CHD7 mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome--the clinical overlap with CHARGE syndrome. Clin Genet 75(1):65-71.
Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP. 1994. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. Science 264(5165):1604-1608.
Kallmann FJ, Schoenfeld WA, Barrera SE. 1944. The genetic aspects of primary eunuchoidism. Am J Mental Deficiency XLVIII(n°3):203-236.
Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. 1999. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. Endocr Rev 20(1):68-100.
Kaminsky ZA, Tang T, Wang SC, Ptak C, Oh GH, Wong AH, Feldcamp LA, Virtanen C, Halfvarson J, Tysk C, McRae AF, Visscher PM, Montgomery GW, Gottesman, II, Martin NG, Petronis A. 2009. DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. Nat Genet 41(2):240-245.
Kaplan JD, Bernstein JA, Kwan A, Hudgins L. 2010. Clues to an early diagnosis of Kallmann syndrome. Am J Med Genet A 152A(11):2796-2801.
Katsanis N. 2004. The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome. Hum Mol Genet 13 Spec No 1:R65-71.
Kim HG, Ahn JW, Kurth I, Ullmann R, Kim HT, Kulharya A, Ha KS, Itokawa Y, Meliciani I, Wenzel W, Lee D, Rosenberger G, Ozata M, Bick DP, Sherins RJ, Nagase T, Tekin M, Kim SH, Kim CH, Ropers HH, Gusella JF, Kalscheuer V, Choi CY, Layman LC. 2010. WDR11, a WD protein that interacts with transcription factor EMX1, is mutated in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. Am J Hum Genet 87(4):465-479.
Kim HG, Kurth I, Lan F, Meliciani I, Wenzel W, Eom SH, Kang GB, Rosenberger G, Tekin M, Ozata M, Bick DP, Sherins RJ, Walker SL, Shi Y, Gusella JF, Layman LC. 2008. Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. Am J Hum Genet 83(4):511-519.
Kim HG, Layman LC. 2011. The role of CHD7 and the newly identified WDR11 gene in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. Mol Cell Endocrinol 346(1-2):74-83.
Kirk JM, Grant DB, Savage MO, Besser GM, Bouloux PM. 1994. Identification of olfactory dysfunction in carriers of X-linked Kallmann's syndrome. Clin Endocrinol (Oxf) 41(5):577-580.
Koenigkam-Santos M, de Castro M, Versiani BR, Diniz PR, Santos AC. 2010. Kallmann syndrome and mirror movements: White matter quantitative evaluation with magnetic resonance imaging. J Neurol Sci 292(1-2):40-44.
Kramer PR, Wray S. 2000. Midline nasal tissue influences nestin expression in nasal-placode-derived luteinizing hormone-releasing hormone neurons during development. Dev Biol 227(2):343-357.
Krawczak M, Thomas NS, Hundrieser B, Mort M, Wittig M, Hampe J, Cooper DN. 2007. Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing. Hum Mutat 28(2):150-158.
Kroisel PM, Windpassinger C, Wagner K, Petek E, Vincent JB, Scherer SW, Spiel G, Artner V, Valtiner E. 2004. De novo translocation t(5;18)(q33.1;q12.1) associated with autistic disorder. Am J Med Genet A 129A(1):98-100.
Laitinen EM, Vaaralahti K, Tommiska J, Eklund E, Tervaniemi M, Valanne L, Raivio T. 2011. Incidence, phenotypic features and molecular genetics of Kallmann syndrome in Finland. Orphanet J Rare Dis 6:41.

LaMantia AS, Bhasin N, Rhodes K, Heemskerk J. 2000. Mesenchymal/epithelial induction mediates olfactory pathway formation. Neuron 28(2):411-425.

Layman WS, Hurd EA, Martin DM. 2011. Reproductive dysfunction and decreased GnRH neurogenesis in a mouse model of CHARGE syndrome. Hum Mol Genet 20(16):3138-3150.

Layman WS, McEwen DP, Beyer LA, Lalani SR, Fernbach SD, Oh E, Swaroop A, Hegg CC, Raphael Y, Martens JR, Martin DM. 2009. Defects in neural stem cell proliferation and olfaction in Chd7 deficient mice indicate a mechanism for hyposmia in human CHARGE syndrome. Hum Mol Genet 18(11):1909-1923.

Legouis R, Hardelin JP, Levilliers J, Claverie JM, Compain S, Wunderle V, Millasseau P, Le Paslier D, Cohen D, Caterina D, et al. 1991. The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. Cell 67(2):423-435.

Leroy C, Fouveaut C, Leclercq S, Jacquemont S, Boullay HD, Lespinasse J, Delpech M, Dupont JM, Hardelin JP, Dode C. 2008. Biallelic mutations in the prokineticin-2 gene in two sporadic cases of Kallmann syndrome. Eur J Hum Genet 16(7):865-868.

Levi G, Puche AC, Mantero S, Barbieri O, Trombino S, Paleari L, Egeo A, Merlo GR. 2003. The Dlx5 homeodomain gene is essential for olfactory development and connectivity in the mouse. Mol Cell Neurosci 22(4):530-543.

Li JD, Hu WP, Boehmer L, Cheng MY, Lee AG, Jilek A, Siegel JM, Zhou QY. 2006. Attenuated circadian rhythms in mice lacking the prokineticin 2 gene. J Neurosci 26(45):11615-11623.

Lieblich JM, Rogol AD, White BJ, Rosen SW. 1982. Syndrome of anosmia with hypogonadotropic hypogonadism (Kallmann syndrome): clinical and laboratory studies in 23 cases. Am J Med 73(4):506-519.

Lien CF, Vlachouli C, Blake DJ, Simons JP, Gorecki DC. 2004. Differential spatio-temporal expression of alpha-dystrobrevin-1 during mouse development. Gene Expr Patterns 4(5):583-593.

Long JE, Garel S, Depew MJ, Tobet S, Rubenstein JL. 2003. DLX5 regulates development of peripheral and central components of the olfactory system. J Neurosci 23(2):568-578.

Lopez-Bigas N, Audit B, Ouzounis C, Parra G, Guigo R. 2005. Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? FEBS Lett 579(9):1900-1903.

Lyssand JS, Whiting JL, Lee KS, Kastl R, Wacker JL, Bruchas MR, Miyatake M, Langeberg LK, Chavkin C, Scott JD, Gardner RG, Adams ME, Hague C. 2010. Alpha-dystrobrevin-1 recruits alpha-catulin to the alpha1D-adrenergic receptor/dystrophin-associated protein complex signalosome. Proc Natl Acad Sci U S A 107(50):21854-21859.

Maestre de San Juan A. 1856. Falta total de los nervios olfactorios con anosmia en un individuo en quien existia una atrofia congenita de los testiculos y miembro viril. Siglo Medico 131:211.

Maiti S, Kumar KH, Castellani CA, O'Reilly R, Singh SM. 2011. Ontogenetic de novo copy number variations (CNVs) as a source of genetic individuality: studies on two families with MZD twins for schizophrenia. PLoS One 6(3):e17125.

Maldonado-Perez D, Evans J, Denison F, Millar RP, Jabbour HN. 2007. Potential roles of the prokineticins in reproduction. Trends Endocrinol Metab 18(2):66-72.

Mason AJ, Hayflick JS, Zoeller RT, Young WS, 3rd, Phillips HS, Nikolics K, Seeburg PH. 1986. A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. Science 234(4782):1366-1371.

Massin N, Pecheux C, Eloit C, Bensimon JL, Galey J, Kuttenn F, Hardelin JP, Dode C, Touraine P. 2003. X chromosome-linked Kallmann syndrome: clinical heterogeneity

in three siblings carrying an intragenic deletion of the KAL-1 gene. J Clin Endocrinol Metab 88(5):2003-2008.
Matarredona ER, Murillo-Carretero M, Moreno-Lopez B, Estrada C. 2005. Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis. Brain Res Brain Res Rev 49(2):355-366.
Matsumoto S, Yamazaki C, Masumoto KH, Nagano M, Naito M, Soga T, Hiyama H, Matsumoto M, Takasaki J, Kamohara M, Matsuo A, Ishii H, Kobori M, Katoh M, Matsushime H, Furuichi K, Shigeyoshi Y. 2006. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. Proc Natl Acad Sci U S A 103(11):4140-4145.
Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV. 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. Biochem Biophys Res Commun 43(6):1334-1339.
McCabe MJ, Gaston-Massuet C, Tziaferi V, Gregory LC, Alatzoglou KS, Signore M, Puelles E, Gerrelli D, Farooqi IS, Raza J, Walker J, Kavanaugh SI, Tsai PS, Pitteloud N, Martinez-Barbera JP, Dattani MT. 2011. Novel FGF8 mutations associated with recessive holoprosencephaly, craniofacial defects, and hypothalamo-pituitary dysfunction. J Clin Endocrinol Metab 96(10):E1709-1718.
Miller AM, Treloar HB, Greer CA. 2010. Composition of the migratory mass during development of the olfactory nerve. J Comp Neurol 518(24):4825-4841.
Mizuno Y, Thompson TG, Guyon JR, Lidov HG, Brosius M, Imamura M, Ozawa E, Watkins SC, Kunkel LM. 2001. Desmuslin, an intermediate filament protein that interacts with alpha -dystrobrevin and desmin. Proc Natl Acad Sci U S A 98(11):6156-6161.
Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahimi OA. 2005. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. Cytokine Growth Factor Rev 16(2):107-137.
Monnier C, Dode C, Fabre L, Teixeira L, Labesse G, Pin JP, Hardelin JP, Rondard P. 2009. PROKR2 missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling activity. Hum Mol Genet 18(1):75-81.
Muglia LJ, Katz M. 2010. The enigma of spontaneous preterm birth. N Engl J Med 362(6):529-535.
Nachtigall LB, Boepple PA, Pralong FP, Crowley WF, Jr. 1997. Adult-onset idiopathic hypogonadotropic hypogonadism--a treatable form of male infertility. N Engl J Med 336(6):410-415.
Naftolin F, Harris GW, Bobrow M. 1971. Effect of purified luteinizing hormone releasing factor on normal and hypogonadotropic anosmic men. Nature 232:496-497.
Negri L, Lattanzi R, Giannini E, De Felice M, Colucci A, Melchiorri P. 2004. Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, modulates ingestive behaviour in rats. Br J Pharmacol 142(1):181-191.
Newey SE, Benson MA, Ponting CP, Davies KE, Blake DJ. 2000. Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. Curr Biol 10(20):1295-1298.
Newey SE, Howman EV, Ponting CP, Benson MA, Nawrotzki R, Loh NY, Davies KE, Blake DJ. 2001. Syncoilin, a novel member of the intermediate filament superfamily that interacts with alpha-dystrobrevin in skeletal muscle. J Biol Chem 276(9):6645-6655.
Ng KL, Li JD, Cheng MY, Leslie FM, Lee AG, Zhou QY. 2005. Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. Science 308(5730):1923-1927.
Okumura A, Nagai K, Okumura N. 2008. Interaction of alpha1-syntrophin with multiple isoforms of heterotrimeric G protein alpha subunits. FEBS J 275(1):22-33.
Peters MF, Sadoulet-Puccio HM, Grady MR, Kramarcy NR, Kunkel LM, Sanes JR, Sealock R, Froehner SC. 1998. Differential membrane localization and intermolecular

associations of alpha-dystrobrevin isoforms in skeletal muscle. J Cell Biol 142(5):1269-1278.

Pinto G, Abadie V, Mesnage R, Blustajn J, Cabrol S, Amiel J, Hertz-Pannier L, Bertrand AM, Lyonnet S, Rappaport R, Netchine I. 2005. CHARGE syndrome includes hypogonadotropic hypogonadism and abnormal olfactory bulb development. J Clin Endocrinol Metab 90(10):5621-5626.

Pitteloud N, Acierno JS, Jr., Meysing A, Eliseenkova AV, Ma J, Ibrahimi OA, Metzger DL, Hayes FJ, Dwyer AA, Hughes VA, Yialamas M, Hall JE, Grant E, Mohammadi M, Crowley WF, Jr. 2006a. Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause both Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. Proc Natl Acad Sci U S A 103(16):6281-6286.

Pitteloud N, Acierno JS, Jr., Meysing AU, Dwyer AA, Hayes FJ, Crowley WF, Jr. 2005. Reversible kallmann syndrome, delayed puberty, and isolated anosmia occurring in a single family with a mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene. J Clin Endocrinol Metab 90(3):1317-1322.

Pitteloud N, Meysing A, Quinton R, Acierno JS, Jr., Dwyer AA, Plummer L, Fliers E, Boepple P, Hayes F, Seminara S, Hughes VA, Ma J, Bouloux P, Mohammadi M, Crowley WF, Jr. 2006b. Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause Kallmann syndrome with a wide spectrum of reproductive phenotypes. Mol Cell Endocrinol 254-255:60-69.

Pitteloud N, Quinton R, Pearce S, Raivio T, Acierno J, Dwyer A, Plummer L, Hughes V, Seminara S, Cheng YZ, Li WP, Maccoll G, Eliseenkova AV, Olsen SK, Ibrahimi OA, Hayes FJ, Boepple P, Hall JE, Bouloux P, Mohammadi M, Crowley W. 2007a. Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. J Clin Invest 117(2):457-463.

Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW, Plummer L, Jacobson-Dickman EE, Mellon PL, Zhou QY, Crowley WF, Jr. 2007b. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. Proc Natl Acad Sci U S A 104(44):17447-17452.

Prosser HM, Bradley A, Chesham JE, Ebling FJ, Hastings MH, Maywood ES. 2007. Prokineticin receptor 2 (Prokr2) is essential for the regulation of circadian behavior by the suprachiasmatic nuclei. Proc Natl Acad Sci U S A 104(2):648-653.

Puc J, Rosenfeld MG. 2011. SOX2 and CHD7 cooperatively regulate human disease genes. Nat Genet 43(6):505-506.

Quaynor SD, Kim HG, Cappello EM, Williams T, Chorich LP, Bick DP, Sherins RJ, Layman LC. 2011. The prevalence of digenic mutations in patients with normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. Fertil Steril 96(6):1424-1430 e1426.

Quinton R, Cheow HK, Tymms DJ, Bouloux PM, Wu FC, Jacobs HS. 1999. Kallmann's syndrome: is it always for life? Clin Endocrinol (Oxf) 50(4):481-485.

Quinton R, Duke VM, de Zoysa PA, Platts AD, Valentine A, Kendall B, Pickman S, Kirk JM, Besser GM, Jacobs HS, Bouloux PM. 1996. The neuroradiology of Kallmann's syndrome: a genotypic and phenotypic analysis. J Clin Endocrinol Metab 81(8):3010-3017.

Quinton R, Duke VM, Robertson A, Kirk JM, Matfin G, de Zoysa PA, Azcona C, MacColl GS, Jacobs HS, Conway GS, Besser M, Stanhope RG, Bouloux PM. 2001. Idiopathic gonadotrophin deficiency: genetic questions addressed through phenotypic characterization. Clin Endocrinol (Oxf) 55(2):163-174.

Raivio T, Avbelj M, McCabe MJ, Romero CJ, Dwyer AA, Tommiska J, Sykiotis GP, Gregory LC, Diaczok D, Tziaferi V, Elting MW, Padidela R, Plummer L, Martin C, Feng B, Zhang C, Zhou QY, Chen H, Mohammadi M, Quinton R, Sidis Y, Radovick S, Dattani MT, Pitteloud N. 2012. Genetic overlap in kallmann syndrome, combined pituitary hormone deficiency, and septo-optic dysplasia. J Clin Endocrinol Metab 97(4):E694-699.

Raivio T, Falardeau J, Dwyer A, Quinton R, Hayes FJ, Hughes VA, Cole LW, Pearce SH, Lee H, Boepple P, Crowley WF, Jr., Pitteloud N. 2007. Reversal of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. N Engl J Med 357(9):863-873.

Raivio T, Sidis Y, Plummer L, Chen H, Ma J, Mukherjee A, Jacobson-Dickman E, Quinton R, Van Vliet G, Lavoie H, Hughes VA, Dwyer A, Hayes FJ, Xu S, Sparks S, Kaiser UB, Mohammadi M, Pitteloud N. 2009. Impaired fibroblast growth factor receptor 1 signaling as a cause of normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab 94(11):4380-4390.

Rando TA. 2001. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. Muscle Nerve 24(12):1575-1594.

Ray PN, Belfall B, Duff C, Logan C, Kean V, Thompson MW, Sylvester JE, Gorski JL, Schmickel RD, Worton RG. 1985. Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. Nature 318(6047):672-675.

Rees ML, Lien CF, Gorecki DC. 2007. Dystrobrevins in muscle and non-muscle tissues. Neuromuscul Disord 17(2):123-134.

Reynaud R, Jayakody SA, Monnier C, Saveanu A, Bouligand J, Guedj AM, Simonin G, Lecomte P, Barlier A, Rondard P, Martinez-Barbera JP, Guiochon-Mantel A, Brue T. 2012. PROKR2 Variants in Multiple Hypopituitarism with Pituitary Stalk Interruption. J Clin Endocrinol Metab.

Riley BM, Mansilla MA, Ma J, Daack-Hirsch S, Maher BS, Raffensperger LM, Russo ET, Vieira AR, Dode C, Mohammadi M, Marazita ML, Murray JC. 2007. Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. Proc Natl Acad Sci U S A 104(11):4512-4517.

Roskams AJ, Bredt DS, Dawson TM, Ronnett GV. 1994. Nitric oxide mediates the formation of synaptic connections in developing and regenerating olfactory receptor neurons. Neuron 13(2):289-299.

Sadoulet-Puccio HM, Khurana TS, Cohen JB, Kunkel LM. 1996. Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the Torpedo electric organ post-synaptic membrane. Hum Mol Genet 5(4):489-496.

Sadoulet-Puccio HM, Rajala M, Kunkel LM. 1997. Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. Proc Natl Acad Sci U S A 94(23):12413-12418.

Salenave S, Chanson P, Bry H, Pugeat M, Cabrol S, Carel JC, Murat A, Lecomte P, Brailly S, Hardelin JP, Dode C, Young J. 2008. Kallmann's syndrome: a comparison of the reproductive phenotypes in men carrying KAL1 and FGFR1/KAL2 mutations. J Clin Endocrinol Metab 93(3):758-763.

Samson M, Peale FV, Jr., Frantz G, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De Meyts E, Ferrara N. 2004. Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis. J Clin Endocrinol Metab 89(8):4078-4088.

Sarfati J, Guiochon-Mantel A, Rondard P, Arnulf I, Garcia-Pinero A, Wolczynski S, Brailly-Tabard S, Bidet M, Ramos-Arroyo M, Mathieu M, Lienhardt-Roussie A, Morgan G, Turki Z, Bremont C, Lespinasse J, Du Boullay H, Chabbert-Buffet N, Jacquemont S, Reach G, De Talence N, Tonella P, Conrad B, Despert F, Delobel B, Brue T,

Bouvattier C, Cabrol S, Pugeat M, Murat A, Bouchard P, Hardelin JP, Dode C, Young J. 2009. A comparative phenotypic study of kallmann syndrome patients carrying monoallelic and biallelic mutations in the prokineticin 2 or prokineticin receptor 2 genes. J Clin Endocrinol Metab 95(2):659-669.

Sato N, Katsumata N, Kagami M, Hasegawa T, Hori N, Kawakita S, Minowada S, Shimotsuka A, Shishiba Y, Yokozawa M, Yasuda T, Nagasaki K, Hasegawa D, Hasegawa Y, Tachibana K, Naiki Y, Horikawa R, Tanaka T, Ogata T. 2004. Clinical assessment and mutation analysis of Kallmann syndrome 1 (KAL1) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1, or KAL2) in five families and 18 sporadic patients. J Clin Endocrinol Metab 89(3):1079-1088.

Schultz J, Hoffmuller U, Krause G, Ashurst J, Macias MJ, Schmieder P, Schneider-Mergener J, Oschkinat H. 1998. Specific interactions between the syntrophin PDZ domain and voltage-gated sodium channels. Nat Struct Biol 5(1):19-24.

Schwab SG, Knapp M, Mondabon S, Hallmayer J, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Lerer B, Rietschel M, Trixler M, Maier W, Wildenauer DB. 2003. Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families. Am J Hum Genet 72(1):185-190.

Schwanzel-Fukuda M, Bick D, Pfaff DW. 1989. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. Brain Res Mol Brain Res 6(4):311-326.

Schwanzel-Fukuda M, Crossin KL, Pfaff DW, Bouloux PM, Hardelin JP, Petit C. 1996. Migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in early human embryos. J Comp Neurol 366(3):547-557.

Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. 1989. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. Nature 338(6211):161-164.

Schwob JE, Szumowski KE, Stasky AA. 1992. Olfactory sensory neurons are trophically dependent on the olfactory bulb for their prolonged survival. J Neurosci 12(10):3896-3919.

Sedita J, Izvolsky K, Cardoso WV. 2004. Differential expression of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase isoforms in the mouse embryo suggests distinctive roles during organogenesis. Dev Dyn 231(4):782-794.

Shaw ND, Seminara SB, Welt CK, Au MG, Plummer L, Hughes VA, Dwyer AA, Martin KA, Quinton R, Mericq V, Merino PM, Gusella JF, Crowley WF, Jr., Pitteloud N, Hall JE. 2011. Expanding the phenotype and genotype of female GnRH deficiency. J Clin Endocrinol Metab 96(3):E566-576.

Slatkin M. 2004. A population-genetic test of founder effects and implications for Ashkenazi Jewish diseases. Am J Hum Genet 75(2):282-293.

Soga T, Matsumoto S, Oda T, Saito T, Hiyama H, Takasaki J, Kamohara M, Ohishi T, Matsushime H, Furuichi K. 2002. Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. Biochim Biophys Acta 1579(2-3):173-179.

Soussi-Yanicostas N, de Castro F, Julliard AK, Perfettini I, Chedotal A, Petit C. 2002. Anosmin-1, defective in the X-linked form of Kallmann syndrome, promotes axonal branch formation from olfactory bulb output neurons. Cell 109(2):217-228.

Spyropoulos B, Moens PB, Davidson J, Lowden JA. 1981. Heterozygote advantage in Tay-Sachs carriers? Am J Hum Genet 33(3):375-380.

Srour M, Riviere JB, Pham JM, Dube MP, Girard S, Morin S, Dion PA, Asselin G, Rochefort D, Hince P, Diab S, Sharafaddinzadeh N, Chouinard S, Theoret H, Charron F, Rouleau GA. 2010. Mutations in DCC cause congenital mirror movements. Science 328(5978):592.

Straub RE, Jiang Y, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, Kadambi B, Cesare AJ, Gibberman A, Wang X, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS. 2002. Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. Am J Hum Genet 71(2):337-348.

Sulz L, Astorga G, Bellette B, Iturriaga R, Mackay-Sim A, Bacigalupo J. 2009. Nitric oxide regulates neurogenesis in adult olfactory epithelium in vitro. Nitric Oxide 20(4):238-252.

Sykiotis GP, Plummer L, Hughes VA, Au M, Durrani S, Nayak-Young S, Dwyer AA, Quinton R, Hall JE, Gusella JF, Seminara SB, Crowley WF, Jr., Pitteloud N. 2010. Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency. Proc Natl Acad Sci U S A 107(34):15140-15144.

Takatoh J, Kudoh H, Kondo S, Hanaoka K. 2008. Loss of short dystrophin isoform Dp71 in olfactory ensheathing cells causes vomeronasal nerve defasciculation in mouse olfactory system. Exp Neurol 213(1):36-47.

Teixeira L, Guimiot F, Dode C, Fallet-Bianco C, Millar RP, Delezoide AL, Hardelin JP. 2010. Defective migration of neuroendocrine GnRH cells in human arrhinencephalic conditions. J Clin Invest 120(10):3668-3672.

Tornberg J, Sykiotis GP, Keefe K, Plummer L, Hoang X, Hall JE, Quinton R, Seminara SB, Hughes V, Van Vliet G, Van Uum S, Crowley WF, Habuchi H, Kimata K, Pitteloud N, Bulow HE. 2011. Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1, a gene involved in extracellular sugar modifications, is mutated in patients with idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism. Proc Natl Acad Sci U S A 108(28):11524-11529.

Tran H, Chen H, Walz A, Posthumus JC, Gong Q. 2008. Influence of olfactory epithelium on mitral/tufted cell dendritic outgrowth. PLoS One 3(11):e3816.

Trarbach EB, Abreu AP, Silveira LF, Garmes HM, Baptista MT, Teles MG, Costa EM, Mohammadi M, Pitteloud N, Mendonca BB, Latronico AC. 2010. Nonsense mutations in FGF8 gene causing different degrees of human gonadotropin-releasing deficiency. J Clin Endocrinol Metab 95(7):3491-3496.

Trarbach EB, Costa EM, Versiani B, de Castro M, Baptista MT, Garmes HM, de Mendonca BB, Latronico AC. 2006a. Novel fibroblast growth factor receptor 1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism with and without anosmia. J Clin Endocrinol Metab 91(10):4006-4012.

Trarbach EB, Costa EM, Versiani B, de Castro M, Baptista MT, Garmes HM, de Mendonca BB, Latronico AC. 2006b. Novel fibroblast growth factor receptor 1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism with and without anosmia. J Clin Endocrinol Metab 91(10):4006-4012.

Treloar HB, Miller AM, Ray A, Greer CA. Development of the Olfactory System.

Truman JW, De Vente J, Ball EE. 1996. Nitric oxide-sensitive guanylate cyclase activity is associated with the maturational phase of neuronal development in insects. Development 122(12):3949-3958.

Tsai PS, Moenter SM, Postigo HR, El Majdoubi M, Pak TR, Gill JC, Paruthiyil S, Werner S, Weiner RI. 2005. Targeted expression of a dominant-negative fibroblast growth factor (FGF) receptor in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons reduces FGF responsiveness and the size of GnRH neuronal population. Mol Endocrinol 19(1):225-236.

Valverde F, Santacana M, Heredia M. 1992. Formation of an olfactory glomerulus: morphological aspects of development and organization. Neuroscience 49(2):255-275.

Verhaagen J, Oestreicher AB, Grillo M, Khew-Goodall YS, Gispen WH, Margolis FL. 1990. Neuroplasticity in the olfactory system: differential effects of central and peripheral

lesions of the primary olfactory pathway on the expression of B-50/GAP43 and the olfactory marker protein. J Neurosci Res 26(1):31-44.

Verloes A. 2005. Updated diagnostic criteria for CHARGE syndrome: a proposal. Am J Med Genet A 133A(3):306-308.

Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BB, Janssen IM, van der Vliet WA, Huys EH, de Jong PJ, Hamel BC, Schoenmakers EF, Brunner HG, Veltman JA, van Kessel AG. 2004. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. Nat Genet 36(9):955-957.

Wagner KR, Cohen JB, Huganir RL. 1993. The 87K postsynaptic membrane protein from Torpedo is a protein-tyrosine kinase substrate homologous to dystrophin. Neuron 10(3):511-522.

Wray S, Nieburgs A, Elkabes S. 1989. Spatiotemporal cell expression of luteinizing hormone-releasing hormone in the prenatal mouse: evidence for an embryonic origin in the olfactory placode. Brain Res Dev Brain Res 46(2):309-318.

Yokoyama S. 1979. Role of genetic drift in the high frequency of Tay-Sachs disease among Ashkenazic Jews. Ann Hum Genet 43(2):133-136.

Yoshida M, Suda Y, Matsuo I, Miyamoto N, Takeda N, Kuratani S, Aizawa S. 1997. Emx1 and Emx2 functions in development of dorsal telencephalon. Development 124(1):101-111.

Zemni R, Bienvenu T, Vinet MC, Sefiani A, Carrie A, Billuart P, McDonell N, Couvert P, Francis F, Chafey P, Fauchereau F, Friocourt G, des Portes V, Cardona A, Frints S, Meindl A, Brandau O, Ronce N, Moraine C, van Bokhoven H, Ropers HH, Sudbrak R, Kahn A, Fryns JP, Beldjord C, Chelly J. 2000. A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. Nat Genet 24(2):167-170.

Zentner GE, Layman WS, Martin DM, Scacheri PC. 2010. Molecular and phenotypic aspects of CHD7 mutation in CHARGE syndrome. Am J Med Genet A 152A(3):674-686.

Zhou QY. 2006. The prokineticins: a novel pair of regulatory peptides. Mol Interv 6(6):330-338.

Zhu H, Tucker HM, Grear KE, Simpson JF, Manning AK, Cupples LA, Estus S. 2007. A common polymorphism decreases low-density lipoprotein receptor exon 12 splicing efficiency and associates with increased cholesterol. Hum Mol Genet 16(14):1765-1772.

ANNEXE I

INDEX DE QUALITÉ DU SOMMEIL DE PITTSBURGH (PSQI)

Nom : Age :

Prénom :

• *Instructions :*
Les questions suivantes ont trait à vos habitudes de sommeil pendant le dernier mois seulement. Vos réponses doivent indiquer ce qui correspond aux expériences que vous avez eues pendant la majorité des jours et des nuits au cours des derniers mois. Répondez s'il vous plaît à toutes les questions.

1. Pendant le mois dernier, quand êtes-vous habituellement allé vous coucher le soir ?
HEURE HABITUELLE DU COUCHER _____

2. Pendant le mois dernier, combien vous a-t-il habituellement fallu de temps (en minutes) pour vous endormir chaque soir ?
NOMBRE DE MINUTES _____

3. Pendant le mois dernier, quand vous êtes-vous habituellement levé le matin ?
HEURE HABITUELLE DU LEVER _____

4. Pendant le mois dernier, combien d'heures de sommeil effectif avez-vous eu chaque nuit ? (ce nombre peut être différent du nombre d'heures que vous avez passé au lit.)
HEURES DE SOMMEIL PAR NUIT _____

Pour chacune des questions suivantes, indiquez la meilleure réponse. Répondez s'il vous plaît à toutes les questions.

5. Pendant le mois dernier, avec quelle fréquence avez-vous eu des troubles du sommeil parce que vous...

a) n'avez pu vous endormir en moins de 30 minutes

Pas au cours du dernier mois ____	Moins d'une fois par semaine ____	Une ou deux fois par semaine ____	Trois ou quatre fois par semaine ____

b) vous êtes réveillé au milieu de la nuit ou précocement le matin

Pas au cours du dernier mois ____	Moins d'une fois par semaine ____	Une ou deux fois par semaine ____	Trois ou quatre fois par semaine ____

c) avez dû vous lever pour aller aux toilettes

Pas au cours du dernier mois ____	Moins d'une fois par semaine ____	Une ou deux fois par semaine ____	Trois ou quatre fois par semaine ____

d) n'avez pu respirer correctement

Pas au cours du dernier mois ____	Moins d'une fois par semaine ____	Une ou deux fois par semaine ____	Trois ou quatre fois par semaine ____

e) avez toussé ou ronflé bruyamment

Pas au cours du dernier mois ____	Moins d'une fois par semaine ____	Une ou deux fois par semaine ____	Trois ou quatre fois par semaine ____

f) eu trop froid

Pas au cours du dernier mois ____	Moins d'une fois par semaine ____	Une ou deux fois par semaine ____	Trois ou quatre fois par semaine ____

g) eu trop chaud

Pas au cours du dernier mois ____	Moins d'une fois par semaine ____	Une ou deux fois par semaine ____	Trois ou quatre fois par semaine ____

h) eu de mauvais rêves

Pas au cours du dernier mois ____	Moins d'une fois par semaine ____	Une ou deux fois par semaine ____	Trois ou quatre fois par semaine ____

i) eu des douleurs

Pas au cours du dernier mois ____	Moins d'une fois par semaine ____	Une ou deux fois par semaine ____	Trois ou quatre fois par semaine ____

j) pour d'autres(s) raison(s). Donnez une description s'il vous plaît :

_____
_____
_____

Combien de fois pendant le mois dernier avez-vous eu des difficultés à dormir à cause de cela?

6. Pendant le mois dernier comment évalueriez-vous globalement la qualité de votre sommeil?

Très bonne _____
Assez bonne _____
Assez mauvaise _____
Très mauvaise _____

7. Pendant le mois dernier, combien de fois avez-vous pris des médicaments (prescrits par votre médecin ou achetés sans ordonnance) pour faciliter votre sommeil ?

Pas au cours du dernier mois ____	Moins d'une fois par semaine ____	Une ou deux fois par semaine ____	Trois ou quatre fois par semaine ____

8. Au cours du dernier mois, combien de fois avez-vous eu des difficultés à demeurer éveillé pendant que vous conduisiez, preniez vos repas, étiez occupé dans une activité sociale ?

Pas au cours du dernier mois ____	Moins d'une fois par semaine ____	Une ou deux fois par semaine ____	Trois ou quatre fois par semaine ____

9. Au cours du mois dernier, à quel degré cela a-t-il reprsenté un problème pour vous d'avoir assez d'enthousiasme pour faire ce que vous aviez à faire ?

Pas du tout un problème _____
Seulement un tout petit problème _____
Un certain problème _____
Un très gros problème _____

10. Avez-vous un conjoint ou un camarade de chambre ?

Ni l'un, ni l'autre _____

Un conjoint/un camarade de chambre dans une chambre différente _____

Un conjoint dans la même chambre mais pas dans le même lit _____

Un conjoint dans le même lit _____

11. Si vous avez un camarde de chambre ou un conjoint, demandez-lui combien de fois le mois dernier vous avez présenté :

a) un ronflement fort

Pas au cours du dernier mois ____ | Moins d'une fois par semaine ____ | Une ou deux fois par semaine ____ | Trois ou quatre fois par semaine ____

b) de longues pauses respiratoires pendant votre sommeil

Pas au cours du dernier mois ____ | Moins d'une fois par semaine ____ | Une ou deux fois par semaine ____ | Trois ou quatre fois par semaine ____

c) des saccades ou des secousses des jambes pendant que vous dormiez

Pas au cours du dernier mois ____ | Moins d'une fois par semaine ____ | Une ou deux fois par semaine ____ | Trois ou quatre fois par semaine ____

d) des épisodes de désorientation ou de confusion pendant le sommeil

Pas au cours du dernier mois ____ | Moins d'une fois par semaine ____ | Une ou deux fois par semaine ____ | Trois ou quatre fois par semaine ____

e) d'autre, motifs d'agitation pendant le sommeil

Pas au cours du dernier mois ____ | Moins d'une fois par semaine ____ | Une ou deux fois par semaine ____ | Trois ou quatre fois par semaine ____

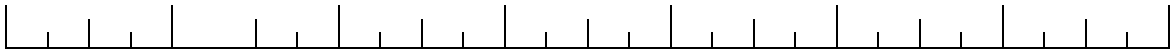
ANNEXE II

1. QUESTIONNAIRE DE TYPOLOGIE CIRCADIENNE DE HORNE ET OSTBERG

Etes vous couche tôt ou couche tard ?

A. Lisez attentivement chaque question avant d'y répondre.
B. Répondez à toutes les questions.
C. Répondez aux questions dans l'ordre.
D. Vous pouvez répondre aux questions les unes indépendamment des autres. Ne revenez pas en arrière pour vérifier votre réponse.
E. Pour les questions à choix multiples, mettez une croix devant une seule réponse. Pour les échelles, placez une croix au point approprié.
F. Répondez à chaque question aussi sincèrement que possible. Vos réponses et *les résultats de ce questionnaire resteront confidentiels.*
G. Faites les commentaires que vous jugerez nécessaires dans la partie prévue sous chaque question.

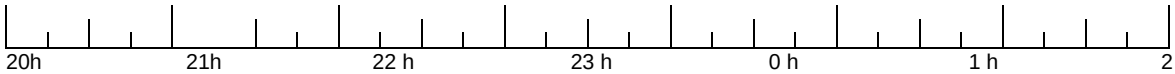
Si vous viviez à votre rythme (celui qui vous plait le plus), à quelle heure vous lèveriez-vous étant entièrement libre d'organiser votre journée ?



< *5* >< *4* >< *3* >< *2* >< *1* >

Commentaire :

Si vous viviez à votre rythme (celui qui vous plait le plus), à quelle heure vous mettriez-vous au lit étant entièrement libre d'organiser votre journée ?



< *5* >< *4* >< *3* >< *2* >< *1* >

Commentaire :

Si vous deviez vous lever à une heure précise, le réveil vous est-il indispensable ?

- pas du tout	*4*
- peu	*3*
- assez	*2*
- beaucoup	*1*

Commentaire :

Dans des conditions adéquates (environnement favorable, sans contraintes particulières, etc.), à quel point cela vous est-il facile de vous lever le matin ?

- pas facile du tout	*1*
- pas très facile	*2*
- assez facile	*3*
- très facile	*4*

Commentaire :

Comment vous sentez-vous durant la demi-heure qui suit votre réveil du matin ?

- pas du tout éveillé	*1*
- peu éveillé	*2*
- relativement éveillé	*3*
- très éveillé	*4*

Commentaire :

Quel est votre appétit durant la demi-heure qui suit votre réveil du matin ?

- pas bon du tout	*1*
- pas bon	*2*
- assez bon	*3*
- très bon	*4*

Commentaire :

Comment vous sentez-vous durant la demi-heure qui suit votre réveil du matin ?

- très fatigué	*1*
- relativement fatigué	*2*
- relativement en forme	*3*
- très en forme	*4*

Commentaire :

Quand vous n'avez pas d'obligations le lendemain, à quelle heure vous couchez-vous par rapport à votre heure habituelle de coucher ?

- rarement ou jamais plus tard	*4*
- moins d'une heure plus tard	*3*
- une à deux heures plus tard	*2*
- plus de deux heures plus tard	*1*

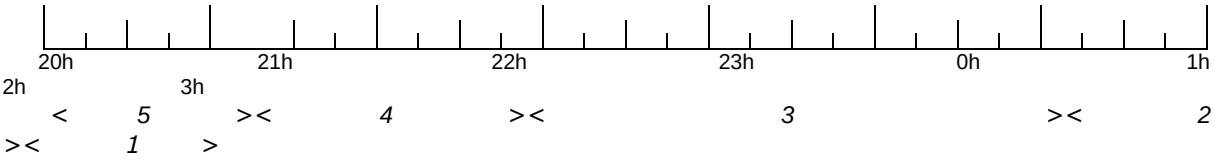
Commentaire :

Vous avez décidé de faire un sport. Un ami vous suggère de faire des séances d'une heure et ceci deux fois par semaine. Le meilleur moment pour lui est de 7 à 8 heure du matin. Ne considérant que le rythme qui vous convient le mieux, dans quelle forme penseriez-vous être ?

- bonne forme	*4*
- forme raisonnable	*3*
- vous trouvez cela difficile	*2*
- vous trouvez cela très difficile	*1*

Commentaire :

A quel moment de la soirée vous sentez-vous fatigué au oint de vous endormir ?



Commentaire :

Vous souhaitez être au meilleur de votre forme pour un examen qui vous demande un effort intellectuel considérable durant deux heures. Vous êtes entièrement libre de le passer quand vous le souhaitez, quelle est l'heure que vous choisiriez ?

- de 8 à 10 heure	*6*
- de 11 à 13 heure	*4*
- de 15 à 17 heure	*2*
- de 19 à 21 heure	*0*

Commentaire :

Si vous alliez au lit à 23 heure, à quel niveau de fatigue seriez-vous ?

- pas du tout fatigué	*0*
- un peu fatigué	*2*
- relativement fatigué	*3*
- très fatigué	*5*

Commentaire :

Pour une raison quelconque, vous vous couchez quelques heures plus tard que d'habitude, mais vous n'êtes pas obligé de vous lever à une heure précise le lendemain. Laquelle des propositions suivantes choisiriez-vous ?

- vous vous réveillez comme d'habitude et vous ne vous rendormez plus	*4*
- vous vous levez comme d'habitude mais vous vous recouchez par la suite	*3*
- vous vous réveillez comme d'habitude mais vous vous rendormez	*2*
- vous vous réveillez plus tard que d'habitude	*1*

Commentaire :

Pour effectuer une garde de nuit, vous êtes obligé d'être réveillé entre 4 et 6 heure du matin. Vous n'avez

pas d'obligation le lendemain. Laquelle des propositions suivantes vous convient le mieux ?

- vous n'irez au lit qu'une fois la garde terminée ☐ *1*
- vous faites une sieste avant et dormez après la garde ☐ *2*
- vous dormez bien avant et faites une sieste après la garde ☐ *3*
- vous dormez ce qu'il faut avant d'effectuer la garde ☐ *4*

Commentaire :

Vous devez faire deux heures de travail physique intense, mais vous êtes entièrement libre d'organiser votre journée. Laquelle des périodes suivantes choisiriez-vous ?

- de 8 à 10 heure ☐ *4*
- de 11 à 13 heure ☐ *3*
- de 15 à 17 heure ☐ *2*
- de 19 à 21 heure ☐ *1*

Commentaire :

Vous avez décidé de faire un sport. Un ami vous suggère de faire des séances d'une heure et ceci deux fois par semaine. Le meilleur moment pour lui est de 22 à 23 heur. Ne considérant que le rythme qui vous convient le mieux, dans quelle forme penseriez-vous être ?

- bonne forme ☐ *1*
- forme raisonnable ☐ *2*
- vous trouvez cela difficile ☐ *3*
- vous trouvez cela très difficile ☐ *4*

Commentaire :

Supposez que vous pouvez choisir les horaires de votre travail. Admettons que vous travaillez 5 heures par jour et que votre travail est intéressant et bien payé. Quelle séquence de 5 heures consécutives choisiriez-vous ?

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	0

MINUIT **MIDI**

MINUIT

< 1 >< 5 >< 4 >< 3 >< 2 >< 1 >

Commentaire :

A quelle heure de la journée vous sentez-vous dans la meilleure forme ?

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	0

MINUIT **MIDI**

MINUIT

< 1 >< 5 >< 4 >< 3 >< 2 >< 1 >

Commentaire :

On dit parfois que quelqu'un est un « sujet du matin » ou un « sujet du soir ». vous considérez-vous comme celui du matin ou du soir ?

- tout à fait un sujet du matin ☐ *6*

- plutôt un sujet du matin		*4*
- plutôt un sujet du soir		*2*
- tout à fait un sujet du soir		*0*

Commentaire :

CALCULEZ VOTRE SCORE

Au dessus de 70 vous êtes	**TOUT À FAIT DU MATIN**
Entre 59 et 69 vous êtes	**DU MATIN MODERE**
Entre 42 et 58 vous êtes	**NEUTRE**
Entre 31 et 41 vous êtes	**DU SOIR MODERE**
Moins de 30 vous êtes	**TOUT A FAIT DU SOIR**