HAL
open science

Contribution à la caractérisation de nouveaux gènes impliqués dans les hypogonadismes hypogonadotropes : caractérisation des mécanismes moléculaires et cellulaires

Bruno Francou

To cite this version:

Bruno Francou. Contribution à la caractérisation de nouveaux gènes impliqués dans les hypogonadismes hypogonadotropes : caractérisation des mécanismes moléculaires et cellulaires. Biologie de la reproduction. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS101 . tel-01527889

HAL Id: tel-01527889

https://theses.hal.science/tel-01527889

Submitted on 26 May 2017

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.

NNT : 2016SACLS101

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N° 568
Signalisations et Réseaux intégratifs en Biologie

Spécialité de Doctorat Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Par

M. Bruno Francou

Contribution à la caractérisation des nouveaux gènes impliqués dans les hypogonadismes hypogonadotropes : caractérisation des mécanismes moléculaires et cellulaires

Thèse présentée et soutenue au Kremlin-Bicêtre le 25 mai 2016

Composition du Jury :

M. CLAUSER Eric	Professeur Université Paris Descartes	Président du Jury
M. PROCACCIO Vincent	Professeur Faculté de médecine d'Angers	Rapporteur
M. RONDARD Philippe	Directeur de recherche INSERM Université de Montpellier	Rapporteur
M. YOUNG Jacques	Professeur Université Paris Sud	Examinateur
Mme GUIOCHON-MANTEL Anne	Professeur Université Paris Sud	Directeur de thèse
M. BOULIGAND Jérôme	Maitre de Conférence Université Paris Sud	Co-directeur de thèse

Remerciements

Ce travail de doctorat a duré 5 ans. Au-delà du champ étroit de mon sujet de recherche, mes observations attentives se sont étendues à moi-même et à mon environnement Les avancées les plus significatives se situent certainement à ce niveau, sur un plan personnel. Il s'agit dans ce chapitre de ma thèse de remercier les personnes ayant participé à ce projet. Ce travail conséquent et minutieux est le résultat de l'engagement de long terme de nombreux chercheurs et de l'aide apportée par le personnel de structures de recherche, de soin et de financement disponibles en France.

Mes premiers remerciements sont à l'adresse de ma directrice de thèse, le Pr Anne Guiochon-Mantel qui a soutenu mon désir de faire de la recherche dès mon arrivée dans le service de Génétique moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie de l'hôpital Bicêtre. Grâce à son impulsion et sa disponibilité dans les délais les plus courts, j'ai pu obtenir le financement de mon Master 2 (Année Recherche dans le cadre de mon internat) puis le poste d'Assistant Hospitalo-Universitaire durant lequel j'ai effectué l'essentiel de mon travail de recherche en parallèle de mon travail hospitalier ainsi que le poste de praticien attaché m'ayant permis de terminer ce travail. Sa confiance et son humanité m'ont permis d'exprimer librement mon enthousiasme ; le respect du travail réalisé et sa rigueur dans la critique, de terminer les travaux commencés.

Je remercie mon co-directeur de thèse, collègue et ami, le Dr Jérôme Bouligand, dont l'enthousiasme pour la recherche est doublé d'un optimisme et d'une confiance inébranlable pour ces collaborateurs. Ces qualités sont au service de son imagination scientifique, reposant une culture large et réfléchie. Elles permettent de résoudre les questions les plus ardues et de surmonter les angoisses et les impasses qui surgissent immanquablement au cours d'un travail de longue haleine.

Je remercie à cette occasion tous les membres du laboratoire de Génétique qui m'ont encouragé au cours de mon assistanat et ont permis par leur rigueur et leurs compétences d'explorer les patients sur le plan génétique dans les conditions difficiles et parfois dégradées de l'hôpital public. Je suis heureux de pouvoir continuer à travailler avec vous tous au sein du service de Génétique moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie.

Je remercie infiniment le Pr Jacques Young pour avoir posé les bases cliniques et scientifiques des travaux de recherche sur les hypogonadismes hypogonadotropes par son travail quotidien auprès des patients avec les équipes du service d'Endocrinologie de l'hôpital Bicêtre. Ses « intuitions » scientifiques, sa vision globale du sujet, sa maitrise précise de la bibliographie sont une source constante de questionnements nouveaux et originaux. Son positionnement est toujours clair vis-à-vis de ses collaborateurs. Son ambition et son exigence scientifique toujours au service de l'avancée de la science et de ses patients. Un grand professeur et un vrai Co-Directeur de mon travail de thèse.

Mes remerciements suivants sont adressés au Dr Marc Lombès, directeur de l'unité de recherche INSERM dans laquelle ont été effectués la partie expérimentale de ces travaux. Sa bienveillance et son soutien à l'ensemble des étudiants qui peuplent son laboratoire sont des bénédictions. Ses critiques constructives et

ses conseils reposant sur son expérience et ses vastes connaissances sont des accélérateurs de projets inégalés.

Je remercie également Say Vienchareun. Que dire ? Indispensable et irremplaçable. Accueil chaleureux, démonstrations techniques, partage des connaissances, gestion émérite de l'organisation au service de tous. Tu es toujours là pour chacun, à chaque étape, pour tous les projets. Ta générosité humaine n'est de plus jamais mise en défaut (et merci pour les adresses d'introuvables et délicieux resto parisiens).

Merci Larbi Amazit, ton sourire et ta philosophie m'ont permis les pauses les plus agréables et drôles qui soient. Tes collaborations précieuses et nos discussions scientifiques sont des sources de motivation toujours renouvelées.

Merci Jérôme Fagart, de m'avoir ouvert les portes du monde tridimensionnel tant attendu de la biologie structurale. Merci pour ta gentillesse et tes compétences uniques.

Merci Géri Méduri pour ton aide et ton enthousiasme en immunohistologie et en littérature anglaise.

A Adela Delcea Voican qui a partagé avec moi d'innombrables manips et de mises au point jusqu'à tard dans le WE mais aussi sa joie de vivre et son amitié. A son mari Cosmin et leur fils Théodore.

A Charlotte Paul qui a partagé avec moi les dernières lignes de ces travaux et les inscrits désormais au soleil.

Merci à toute l'équipe INSERM de m'avoir accueilli, aidé et fait partager repas et champagne. Mention spéciale à Claudia Grangetaud et à Patricia Fragen qui ont permis une logistique fluide et de calmer mes angoisses administratives.

Une pensée particulière pour les doctorants qui m'ont guidé à mon arrivée : Fréderic Brioude, Laëtitia Martinerie, Junaid Ali Khan, Audrey Roseau et Catherine Bellance (et pour la danse du L2 et les invocations aux dieux du Western Blot ou de la mutagénèse dirigée).

Aux étudiants qui sont arrivé en même temps que moi en M2 et qui ont créé une si bonne atmosphère malgré nos pertes de repères compréhensibles dans un laboratoire de recherche : Emmanuelle Kuhn, Ségolène Hescot, Lavinia Vija, Anne Lyse Lecoq, Julien Auffret, Vixra Keo, Justine Bouilly. Aux étudiants qui nous ont rejoints et ont repris le flambeau de l'animation : Luigi Maione, Nathalie Esber, Mohsen Ayrout, Jérôme Nevoux, Ingrid Lema etc…

Aux chercheurs expérimentés qui m'ont accueilli dans leur laboratoire, conseillé et critiqué de la meilleure manière au cours de ces années d'expériences et de présentations scientifiques : Damien Le Menuet, Nadine Binard, Stéphanie Chauvin, Hughes Loosfelt, Nadège Carré, Bruno Fève.

Je veux aussi remercier, mes amis et ma famille pour leur soutien et leur présence malgré l'intermittence de mes disponibilités. Mes réussites sont les vôtres.

TABLE DES MATIERES

Table des Matières 1

Liste des Figures 3

Liste des Abréviations 5

Introduction 6

PREAMBULE 6
DEFINITION DE L'AXE GONADOTROPE 7
PHYSIOLOGIE DE L'AXE GONADOTROPE 7
EMBRYOLOGIE DE L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSAIRE 7
ACTIVATION DE L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-GONADIQUE 9
DEFINITION DES HYPOGONADISMES HYPOGONADOTROPES 11
ÉPIDEMIOLOGIE 12
MISE EN EVIDENCE D'UN CHH 13
PRESENTATION CLINIQUE ET BIOLOGIQUE 13
DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL 16
RETARD PUBERTAIRE SIMPLE 16
HYPOGONADISMES HYPOGONADOTROPES FONCTIONNELS 16
HYPOGONADISMES HYPOGONADOTROPES ACQUIS 17
TRAITEMENT 18
DEVELOPPEMENT DES CARACTERES SEXUELS SECONDAIRES DURANT L'ENFANCE 19
DEVELOPPEMENT DES CARACTERES SEXUELS SECONDAIRES DURANT L'ADOLESCENCE ET L'AGE ADULTE 19
INDUCTION DE LA FERTILITE CHEZ L'HOMME 20
INDUCTION DE LA FERTILITE CHEZ LA FEMME 20
ÉTIOLOGIES GENETIQUES DES CHH 22
HYPOGONADISMES HYPOGONADOTROPES SANS ANOSMIE 22
THEORIE DU GENERATEUR DE PULSATILITE HYPOTHALAMIQUE 28
SYNDROME DE KALLMANN 28
HYPOGONADISMES HYPOGONADOTROPES SYNDROMIQUES 33
CONSEIL GENETIQUE 35

Problématique – Objectifs 38

Partie I : Prévalence des mutations, caractérisation moléculaire des évènements et profils neuroendocriniens de patients porteurs de mutations des gènes de la signalisation hypothalamique gonadotrope 40

nCHH Classique par mutations de *KISS1R* **41**
Introduction de l'article *Brioude et al PLoS One 2013* 41
Conclusion de l'article *Brioude et al. PLoS One 2013* 44
Introduction de l'article *Francou et al. Hum Reprod. 2016* 46
Conclusion de l'article *Francou et al. Hum Reprod. 2016* 48
nCHH par mutations de *TAC3* et *TACR3* **50**
Introduction de l'article *Young et al. J Clin Endocrinol Metab. 2010* 50
Conclusion de l'article *Young et al. J Clin Endocrinol Metab. 2010* 52
Introduction de l'article *Francou et al. PLoS One 2011* 53
Conclusion de l'article *Francou et al. PLoS One 2011* 56
Test Clinique d'utilisation de la Kisspeptine chez des patients mutes pour la voie de la Neurokinine B **58**
Introduction de l'article *Young et al. Neuroendocrinology 2013* 58
Conclusion de l'article *Young et al. Neuroendocrinology 2013* 61
Description statistique de la serie de patients atteints de nCHH **62**
Introduction 62
Resultats 62
Conclusion 64

Partie II : Identification de nouveaux gènes des HH syndromiques **66**

Identification de nouveaux genes par methodes sans a priori **67**
Introduction de l'article *Young et al. Hum Reprod. 2012* 68
Conclusion de l'article *Young et al. Hum Reprod. 2012* 69
Introduction Syndrome de Boucher-Neuhauser / Gordon Holmes 71
Strategie d'etude genetique d'une famille presentant un Syndrome de Boucher-Neuhauser / Gordon Holmes 74
Conclusion Syndrome de Boucher-Neuhauser / Gordon Holmes 81
Identification de nouveaux genes par methodes avec a priori : Genes Candidats **82**

Discussion Générale **85**

Conclusion Generale **95**

Bibliographie **96**

Articles originaux 112
Revue Générale 113
Chapitre de livre 113
Presentations Orales en congres : 113
Presentations affichees en congres : 115

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Axe hypothalomo-hypophyso-gonadique chez la femme
Figure 2 Migration des neurones à GnRH pendant la vie embryonnaire chez la souris à partir de la placode olfactive dans un modèle murin
Figure 3 Représentation schématique des différentes fibres nerveuses afférentes aux neurones à GnRH
Figure 4 Axe hypothalamo-hypophyso-gonadique chez le mâle
Figure 5 Représentation schématique de l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique
Figure 6 Étiologies des hypogonadismes hypogonadotropes
Figure 7 Variabilité des phénotypes dans les hypogonadismes hypogonadotropes
Figure 8 Nombre de femmes et d'hommes avec hypogonadisme hypogonadotrope congénital (CHH) suivis au centre hospitalier universitaire de Bicêtre
Figure 9 IRM de la région des bulbes et sillons olfactifs
Figure 10 Aspect génital d'un jeune homme atteint d'un syndrome de Kallmann à l'âge de 18 ans
Figure 11 Aspect clinique d'une jeune femme de 22 ans atteinte d'un HHC consultant pour aménorrhée primaire à l'âge de 18 ans
Figure 12 Stade du développement pubertaire selon Tanner
Figure 13 Principales difficultés vécues et rapportées par des patients CHH nécessitant une prise en charge médicale
Figure 14 Récapitulatif des objectifs et des traitements dans l'enfance, l'adolescence et l'âge adulte
Figure 15 Séquence peptidique du prépropeptide Wild-type de la GnRH (92 AA) et du peptide muté putatif (42 AA)
Figure 16 Structure des kisspeptines
Figure 17 Génotypage et établissement des haplotypes ayant permis de situer le locus 19p13 lié au nCHH dans une famille consanguine.
Figure 18 Familles nCHH ayant permis l'identification de *TACR3* par analyses de liaison d'après les données de puces SNPs
Figure 19 Proposition de modèle pour la génération d'une activité rythmique des neurones KNDy dans le noyau arqué de l'hypothalamus permettant la pulsatilité de la sécrétion de GnRH au niveau de l'éminence médiane.
Figure 20 Modulation des neurones KNDy et Théorie du générateur de pulsatilité hypothalamique
Figure 21 Physiopathologie du syndrome de Kallmann
Figure 22 Modèle théorique alternatif d'interaction entre FGFR1 et son ligand, l'Anosmine-1 et l'héparine sulfate (HS)
Figure 23 Schéma illustrant le rôle des gènes dans l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire
Figure 24 Caractéristiques génétiques et cliniques associées aux mutations des gènes responsables de SK et nCHH
Tableau 1 Tableau et histogramme des 874 patients nCHH analysés à Bicêtre

Figure 25 Représentation schématique des voies de signalisation des facteurs permettant la croissance et l'orientation des axones chez l'homme
Figure 26 Structure tridimensionnelle protéique de SEMA3A
Figure 27 Structure tridimensionnelle de l'interaction protéique du double trimère de SEMA3A, de la neuropiline1 et de la PlexineA2
Figure 28 Représentation schématique des neurones à GnRH et des axones voméro-nasal chez les souris sauvages et mutées
Tableau 2 Tableau des cas rapportés assimilables au Syndrome de Gordon Holmes ou de Boucher – Neuhauser entre 1907 et 2003
Figure 29 Exploration dynamique de la fonction gonadotrope de la patiente 2 de la famille L… atteinte du syndrome de Boucher-Neuhauser
Figure 30 Exploration cérébrale par IRM chez les patients 1 et 2 de la famille L….
Figure 31 Angiographie du fond d'œil du patient 1 de la famille L… atteint du syndrome de Gordon Holmes
Figure 32 Arbre généalogique de la famille L… et exemple du fichier pedFile.pro correspondant
Figure 33 Analyse de liaison de la famille L….
Figure 34 Familles et analyses de liaison par marqueurs microsatellites ayant permis l'identification de mutations de *PNPLA6* dans les paraplésies spastiques.
Figure 35 Voie métabolique de la Neuropathy Target Esterase dans le métabolisme de la phosphatidylcholine
Figure 36 Représentation schématique du fonctionnement de la NTE (Neuropathy Target Esterase) enchâssée dans la membrane du réticulum
Figure 37 Phénotype Swiss-Cheese au niveau des cellules gliales et des neurones de la drosophile sws
Figure 38 Résultat des exomes de la famille L…
Figure 39 Génotypage de *PNPLA6* dans la famille L…
Figure 40 Patients analysés par NGS à Bicêtre : Phénotype CHH et taux d'élucidation génétique par le panel
Figure 41 Mutation intronique de FGFR1 créant un site d'épissage en amont de l'exon 2
Figure 42 Délétion hétérozygote intragénique de FGFR1 mise en évidence par NGS après capture

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Acides Aminés
ARC	Noyau arqué (Arcuate nucleus)
AVPV	Noyau périventriculaire antéroventrale
BNS	Boucher-Neuhauser
CGH-array	Comparative Genome Hybridation sur puce
CHH	Hypogonadisme hypogonadotrope congénitaux
C-Term	Extrémité C-terminale
CXCR-4	Chemokine receptor
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FGF	Facteur de croissance des Fibroblastes
FGFR	Récepteur des facteurs de croissance des Fibroblastes
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GH	Gordon Holmes
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
GPC	Glycérophosphocholine
hCG	human Chorionic Gonadotrophin
HGF	Hepatocyte growth factor
HH	Hypogonadisme Hypogonadotrope
HS	Sulfate d'héparine
IC	Intervalle de confiance
IP3	Inositol triphosphate
IRM	Imagerie par résonance magnétique
KNDy	Kisspeptine / Neurokinine B / Dynorphine
KO	Knockout
Kp	Kisspeptine
LH	Luteinizing Hormone
LPC	Lysophosphatidylcholine
nCHH	Hypogonadisme hypogonadotrope congénital sans anosmie
NELF	Nasal Embryonic LHRH Factor
NGS	Séquençage Nouvelle Génération
NMD	Nonsense-Mediated Decay
NTE	Neuropathy Target Esterase
N-Term	Extrémité N-terminale
OGE	Organes génitaux externes
OPRK1	Kappa opiod receptor
PC	Phosphatidylcholine
PNPLA6	Patatin like domain containing 6
POA	Aire préoptique (Preoptical area)
PROK2	Prokineticin 2
PROKR2	Prokineticin Receptor 2
RPS	Retard Pubertaire Simple
SDF1	Stromal cell-derived factor 1
SEMA3A	Semaphorine 3A
SK	Syndrome de Kallmann
WT	Wild-Type

INTRODUCTION

Préambule

Ce travail de doctorat a été réalisé sur des pathologies de l'axe gonadotrope d'origine centrale. Il se place à l'interface des thématiques du service de Génétique moléculaire et Hormonologie, du service d'Endocrinologie de l'hôpital Bicêtre et de l'unité INSERM U1185 spécialisée dans la physiologie de la reproduction.

Mes efforts ont particulièrement porté sur la caractérisation de formes génétiques nouvelles ou émergentes de ces pathologies qui révèlent, à travers ses altérations génétiques, le rôle et le fonctionnement du système gonadotrope au cours du développement, de la puberté et de son maintien à l'âge adulte nécessaire à la reproduction.

Afin de mieux comprendre ces pathologies et les travaux présentés, l'introduction de ce mémoire permettra de rappeler le développement et la physiologie de l'axe gonadotrope, de positionner les pathologies qui nous occuperont par rapport à cet axe, de préciser les causes génétiques identifiées, leurs modes de transmission et leurs particularités phénotypiques. Enfin, nous terminerons par la présentation de nos objectifs et des travaux réalisés dans le cadre de la thèse.

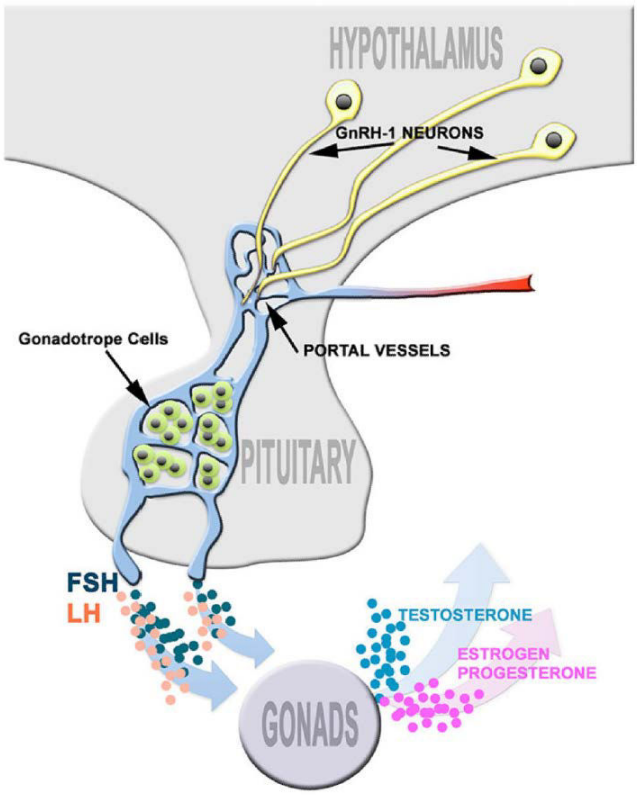


Figure 1 : Axe hypothalomo-hypophyso-gonadique chez la femme.
Les neurones à GnRH sécrètent la GnRH au niveau de l'éminence médiane de l'hypothalamus dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Les cellules gonadotropes situées dans l'anté-hypophyse synthétisent et sécrètent les gonadotrophines LH et FSH dans la circulation sanguine. Les variations de concentration de LH et FSH contrôlent la synthèse des stéroïdes sexuels par les gonades. Ces stéroïdes effectuent un rétrocontrôle négatif au niveau central.

D'après Forni et al., Front. Neuroendocrinol , 2014

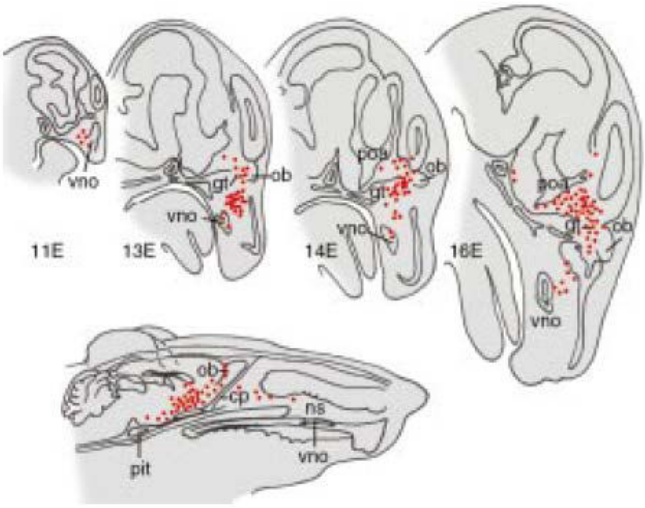


Figure 2 : Migration des neurones à GnRH pendant la vie embryonnaire chez la souris à partir de la placode olfactive dans un modèle murin.
Abréviations : Vno : organe voméro-nasal ; ob : bulbe olfactif ; poa : aire préoptique ; pit : hypophyse ;cp : lame criblée ; ns : septum nasal.

D'après Young, Encyclopédie Médico-Chirurgicale, 2010

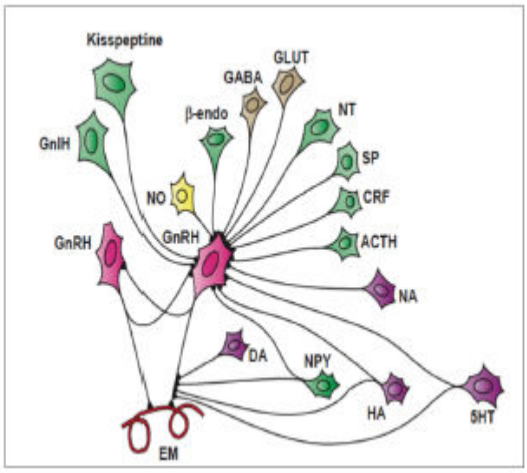
Définition de l'axe gonadotrope

L'axe gonadotrope est le système neuroendocrinien qui contrôle la fonction de la reproduction. Il est constitué des trois étages qui sont l'hypothalamus, l'hypophyse et les gonades. Les altérations de la fonction de l'axe gonadotrope altèrent la fonction de la reproduction en altérant la fonction gonadique et sont à l'origine d'infertilités. En rapport avec l'axe gonadotrope, on classe ces infertilités ou « Hypogonadismes » en deux grandes catégories. Les formes centrales, associées à un déficit gonadotrope central, d'origine hypothalamique ou hypophysaire, sont qualifiées d' « hypogonadismes hypogonadotropes » (HH). À l'opposé, les insuffisances gonadiques caractérisées par une résistance aux gonadotrophines sont quant à elles qualifiées d'« hypogonadismes hypergonadotropes » **(*Cf.* Figure 1)**.

Physiologie de l'axe gonadotrope

Embryologie de l'axe hypothalamo-hypophysaire

Les neurones à Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) sont issus de la différenciation de cellules embryonnaires provenant de la placode olfactive où ils sont identifiables dès la 6ème semaine de gestation. Les cellules précurseur des neurones à GnRH migrent dans le système nerveux central durant le développement embryonnaire. Cette migration s'effectue à travers la lame criblée de l'ethmoïde en association avec les axones en croissance des neurones primaires olfactifs sous le contrôle de molécules chimio-attractives et chimio-répulsives et de neurotransmetteurs (stromal cell-derived factor 1 (SDF1)/chemokine receptor (CXCR-4), GABA, Hepatocyte growth factor (HGF)/Met receptor, PlexinB1, Semaphorins (3A, F, 4D, 7A), Nasal embryonic LHRH factor (NELF)) jusqu'à l'hypothalamus où ils quittent leurs guides axonaux et se dispersent dans le parenchyme cérébral et arrêtent leurs migrations **(*Cf.* Figure 2)**. À la naissance les neurones à GnRH ont atteint leur localisation finale. Les corps cellulaires sont situés dans l'hypothalamus au niveau de l'aire pré-optique alors que les axones se



Monoaminergiques
- Catécholamines
- Indolamines (5HT)

Peptidergiques
- Opiacés : ß-endorphines
- NPY
- SP (Tac1)
- Kisspeptine
- GnIH (RFRP)

Dérivés gazeux
- NO

Acides aminés ou dérivés
- GABA
- Glutamate

GnRH

Figure 3 : Représentation schématique des différentes fibres nerveuses afférentes aux neurones à GnRH.

prolongent jusqu'à l'éminence médiane. Le neuropeptide GnRH secrété par les neurones à GnRH au niveau de l'éminence médiane agit à distance sur l'hypophyse par le système porte hypothalamo-hypophysaire.

Le système porte hypothalamo-hypophysaire se situe dans la tige pituitaire reliant l'hypothalamus à l'hypophyse située au niveau de la selle turcique. Cette dernière se compose de deux parties : l'antéhypophyse d'origine ectoblastique et la posthypophyse d'origine neurectodermique. Le développement des cellules gonadotropes au sein de l'antéhypophyse a lieu à partir des 15ème -16ème semaines de développement chez le fœtus féminin, mais seulement à partir de la 20ème semaine chez le fœtus masculin. Le nombre et la taille de ces cellules gonadotropes augmentent après la puberté.

La GnRH hypothalamique agit par liaison à son récepteur GNRHR exprimé par les cellules gonadotropes dans l'antéhypophyse. Son action régule à la fois la synthèse et la sécrétion des gonadotrophines Luteinizing Hormone (LH) et Follicle Stimulating Hormone (FSH). À l'âge adulte, les gonadotrophines contrôlent la maturation des gonades et la physiologie de la reproduction.

Les neurones à GnRH après leur migration sont inclus dans un réseau neuronal complexe qui leur relaye de nombreuses informations importantes pour la reproduction telles que le niveau des hormones stéroïdiennes et le statut métabolique. De nombreuses afférences neuronales convergent sur les neurones à GnRH [1] **(*Cf.* Figure 3)**. Des études génétiques et physiologiques, certaines réalisées dans le cadre de ce doctorat, chez l'homme et l'animal ont permis d'établir que la signalisation de la Kisspeptine est essentielle pour le rétrocontrôle positif de la GnRH et de la sécrétion des gonadotrophines, de la génération de l'élévation de la LH pré ovulatoire ainsi que la signalisation par la Neurokinine B. Ces travaux ont de plus permis d'identifier de nouvelles sous populations neuronales dans le noyau arqué et le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ou hypothalamus médian capables de sécréter à la fois la Kisspeptine et la Neurokinine B.

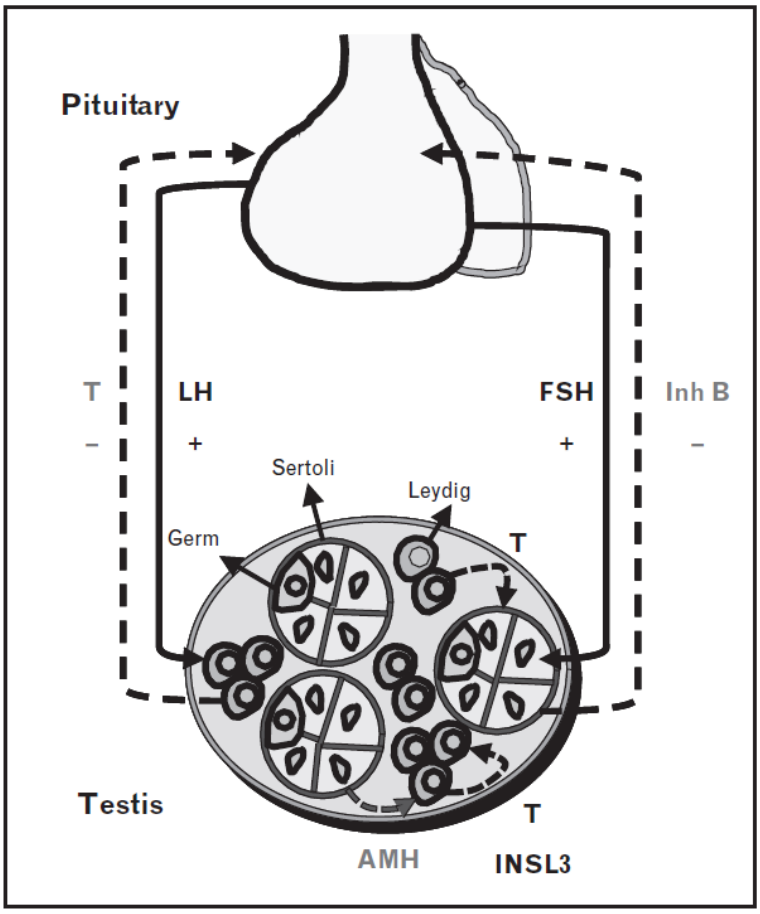


Figure 4 : Axe hypothalamo-hypophyso-gonadique chez le mâle.
La LH et la FSH sont secrétées par les cellules gonadotropes. Sous l'effet de la LH, les cellules de Leydig du tissu interstitiel synthétisent de la testostérone (T) qui agit de manière autocrine et paracrine sur les cellules de Sertoli localisées dans les tubes séminifères. Cette testostérone est également libérée dans la circulation sanguine afin d'agir sur les différents organes cibles et exerce également au niveau des cellules gonadotropes un signal de rétrocontrôle négatif sur la LH. La cellule de Leydig secrète aussi l'insulin-like peptide 3 (INSL3).
La FSH exerce une action stimulatrice sur la cellule de Sertoli et régule la sécrétion de l'hormone antimüllérienne (AMH) et l'inhibine B; cette hormone étant la principale régulatrice de la FSH au niveau central par rétrocontrôle négatif.

D'après Valeri et al., Current Opinion in Endocrinology, 2013

Activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

Période anté et néonatale :

L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique régule la puberté, période de transition entre l'enfance et l'âge adulte pendant laquelle la capacité reproductive est atteinte.
Cet axe est déjà actif *in utero* et quelques mois après la naissance (mini-puberté) puis est mis au repos jusqu'à sa réactivation lors de la puberté.

Chez l'homme, la GnRH est décelable dans l'hypothalamus dès la 8ème semaine d'aménorrhée et l'axe gonadotrope est activé dès la 16ème semaine de grossesse. Les taux sériques de Luteinizing Hormone (LH) et Follicle Stimulating Hormone (FSH) augmentent progressivement pour atteindre un pic à la 20ème semaine puis diminuent dans la seconde partie de la grossesse en raison d'un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire par les stéroïdes sexuels (stéroïdes provenant de la gonade fœtale et estrogènes maternels) [2].

Chez le garçon, durant le troisième trimestre de grossesse, la testostérone synthétisée *in utero* sous l'effet de la LH fœtale permet la croissance du pénis et la migration testiculaire.

Puberté et reproduction

Vers 8-9 ans, avant l'apparition des signes cliniques de la puberté, on peut observer des pics de sécrétion de LH, tout d'abord nocturnes, en relation avec une sécrétion de GnRH influencée par un rythme circadien et associée aux états du sommeil (lent profond et paradoxal). Puis cette sécrétion pulsatile s'étend progressivement sur l'ensemble de la journée avec l'avancée de la puberté.

Chez le garçon, la FSH stimule la prolifération des cellules de Sertoli et des spermatogonies, tandis que la LH stimule les cellules de Leydig produisant de la testostérone. Cette double stimulation par les cellules de Sertoli et par la concentration élevée (50 à 100 plus élevées) de testostérone intratesticulaire permet l'établissement de la spermatogenèse [3] **(*Cf.* Figure 4)**.

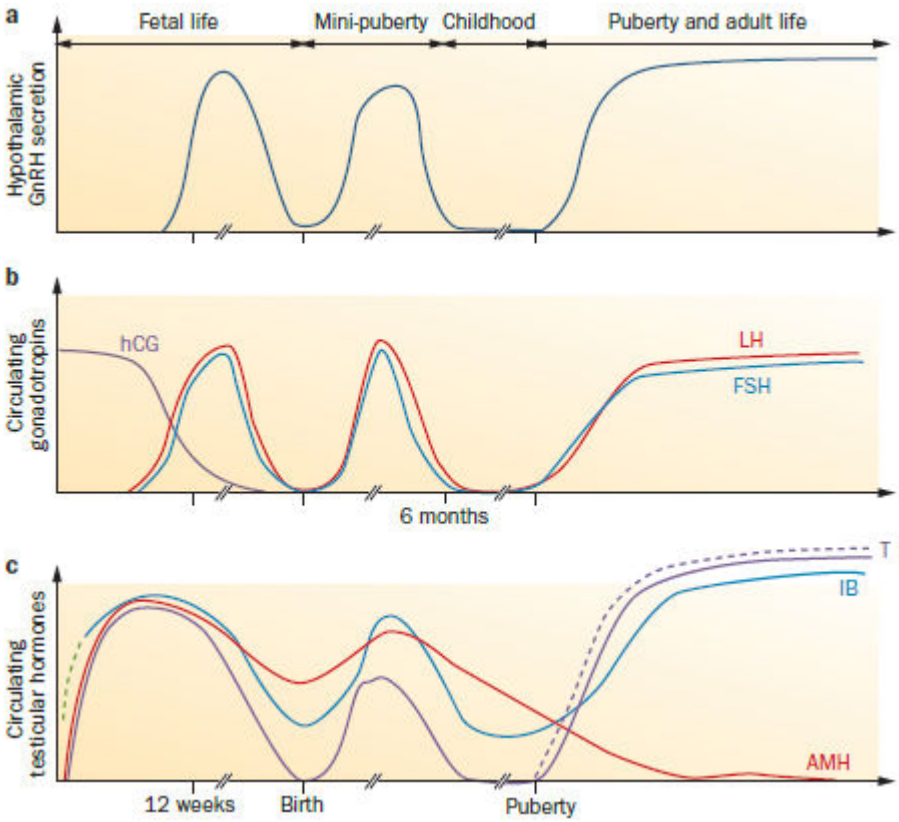


Figure 5 : Représentation schématique de l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

D'après Salenave et al., Ann. Endocrinol., 2012

Chez la fille, les premières étapes de la croissance folliculaire sont initiées par des facteurs intraovariens. Les gonadotrophines circulantes sont nécessaires en revanche pour la maturation des follicules jusqu'à l'ovulation. En effet, la LH stimule la production d'androgènes par les cellules de la thèque. La FSH favorise le recrutement de follicules secondaires et la sécrétion d'œstradiol par les cellules de la granulosa **(*Cf.* Figure 5)**.

L'âge d'apparition des premières manifestations de la puberté est sujet à de grandes variabilités interindividuelles. Elles apparaissent autour de l'âge de 10 ans ([8-13]) chez les filles (développement mammaire), et de 11.5 ans ([9-14]) chez le garçon (augmentation du volume testiculaire et spermatogenèse)[4,5]. Les manifestations principales suivantes de la puberté sont la ménarche chez la fille qui survient autour de l'âge de 12.5 ans, la poussée de croissance et la transformation de la voix chez le garçon **(*Cf.* Figure 5)**.

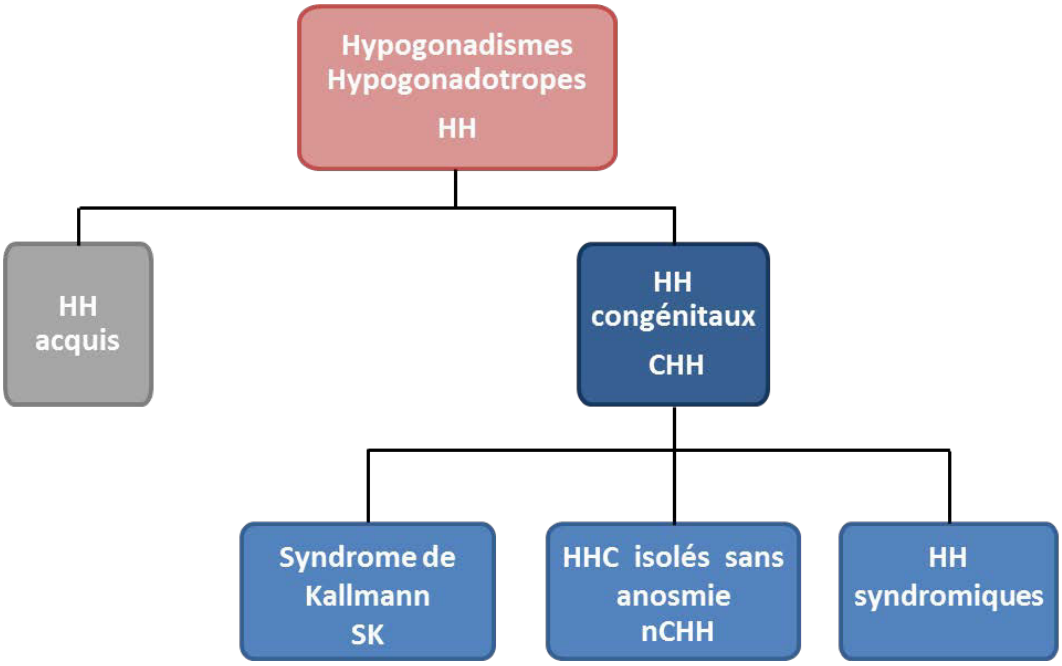


Figure 6 : Etiologies des hypogonadismes hypogonadotropes.

Définition des hypogonadismes hypogonadotropes

Les hypogonadismes hypogonadotropes (HH) sont des pathologies causées par un déficit de production, de sécrétion ou d'action de la Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH). La GnRH est un neuropeptide hypothalamique qui exerce un rôle central dans le contrôle de la fonction de la reproduction. Un des arguments en faveur du rôle essentiel de ce neuropeptide dans la fonction de reproduction est l'extrême conservation de ce peptide de seulement 10 acides aminés (décapeptide) chez les mammifères [6].

Dans l'espèce humaine, une des conséquences caractéristiques du déficit en signalisation GnRH est la sécrétion anormale ou absente des gonadotrophines FSH et LH. Ce déficit gonadotrope altère à la fois la fonction endocrine et exocrine des gonades. L'altération de la fonction endocrine est marquée par le défaut de sécrétion des stéroïdes gonadiques, testostérone et œstradiol. Les HH sont généralement associés à des anomalies du développement pubertaire (développement incomplet ou absence de développement) et des troubles de la fertilité, qui peuvent être plus ou moins sévères.

Les HH sont aussi définis selon leur origine : qu'ils soient acquis (HH acquis) ou congénitaux (CHH).

Les CHH peuvent se présenter sous forme de déficit gonadotrope isolé ou bien être associés à d'autres anomalies du développement telles que, un défaut d'olfaction, différentes anomalies de la ligne médiane (fentes labiale ou palatine), des anomalies du squelette, des agénésies dentaires, des anomalies de l'oreille avec ou sans défaut de l'audition, des agénésies rénales, des anomalies neurologiques à type de syncinésies bimanuelles.

Les CHH sont répartis classiquement en trois grandes catégories : les CHH syndromiques, les HH avec anosmie ou syndrome de Kallmann (SK), et les HH isolés avec olfaction normale aussi qualifiés de CHH sans anosmie ou « normosmique » (nCHH) **(*Cf.* Figure 6)**.

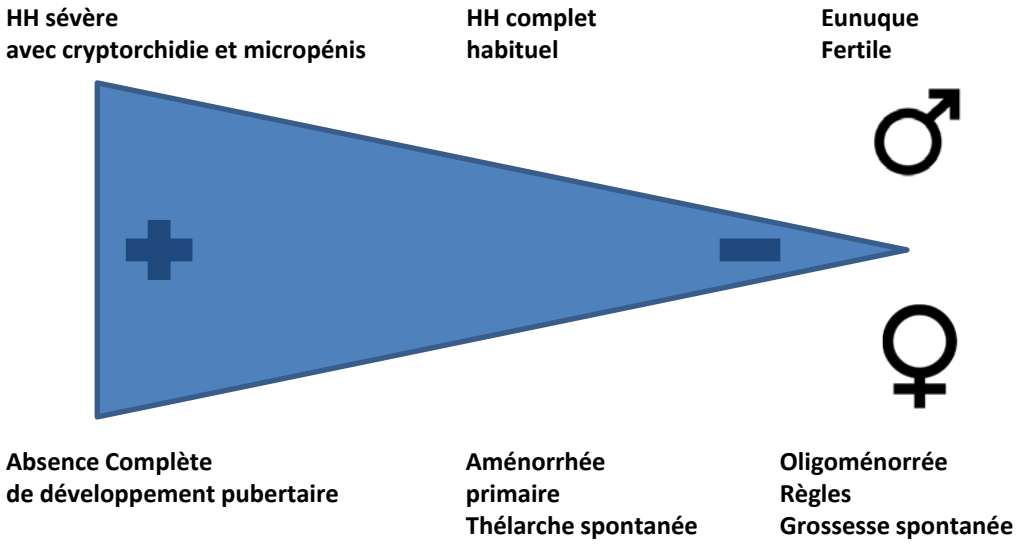


Figure 7 : Variabilité des phénotypes dans les hypogonadismes hypogonadotropes.

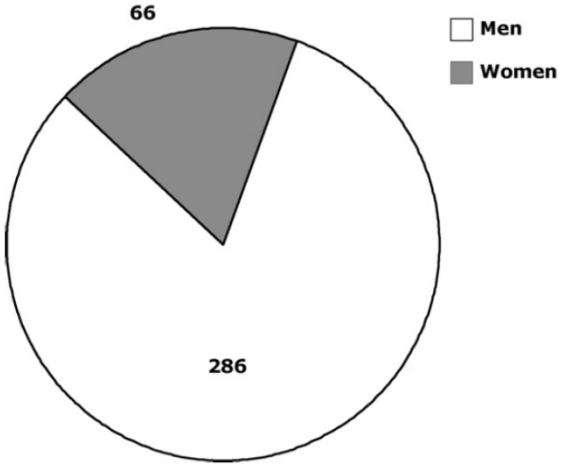


Figure 8 : Nombre de femmes et d'hommes avec hypogonadisme hypogonadotrope congénital (CHH) suivis au centre hospitalier universitaire de Bicêtre en 2010.

D'après Bry-Gauillard et al, Annales d'Endocrinologie, 2010

La pénétrance est incomplète et l'expression de la maladie est variable d'un individu à l'autre avec des tableaux cliniques hétérogènes chez des patients portant la même mutation. Les phénotypes des patients peuvent être divers avec des atteintes allant de l'impubérisme complet à des formes pauci symptomatiques selon le degré de sévérité de l'hypogonadisme hypogonadotrope **(*Cf.* Figure 7)**.

Le mode de découverte de la maladie diffère selon l'âge. Chez les garçons, il est possible d'observer dès la naissance des signes d'hypogonadisme (micropénis et cryptorchidie) causés par l'absence de sécrétion de LH *in utero*. Dans les deux sexes, la pathologie est le plus fréquemment découverte à l'adolescence devant une puberté absente ou partielle. Elle est également à évoquer à l'âge adulte dans les cas d'infertilités associés à une diminution de sécrétion des gonadotrophines.

Épidémiologie

Les HHC sont des pathologies rares dont la prévalence est encore mal définie, car peu d'études épidémiologiques sont disponibles. Chez l'homme, les séries militaires initiales datant de 1973 rapportent une prévalence comprise entre 1/4000 et 1/10000 [7]. Plus récemment, une prévalence comprise entre 1/4000 et 1/8000 [8,9] a été avancée.

Cette prévalence est considérée comme trois à cinq fois moins importante chez les femmes [10]. Ce déséquilibre de représentation entre les sexes est probablement dû à des biais de recrutement (séries militaires et hospitalières) et au phénotype plus discret de l'HHC dans le sexe féminin (absence des signes évocateurs tels que micropénis et/ou cryptorchidie), à l'usage de la contraception, rendant le diagnostic plus difficile chez les femmes **(*Cf.* Figure 8)**.

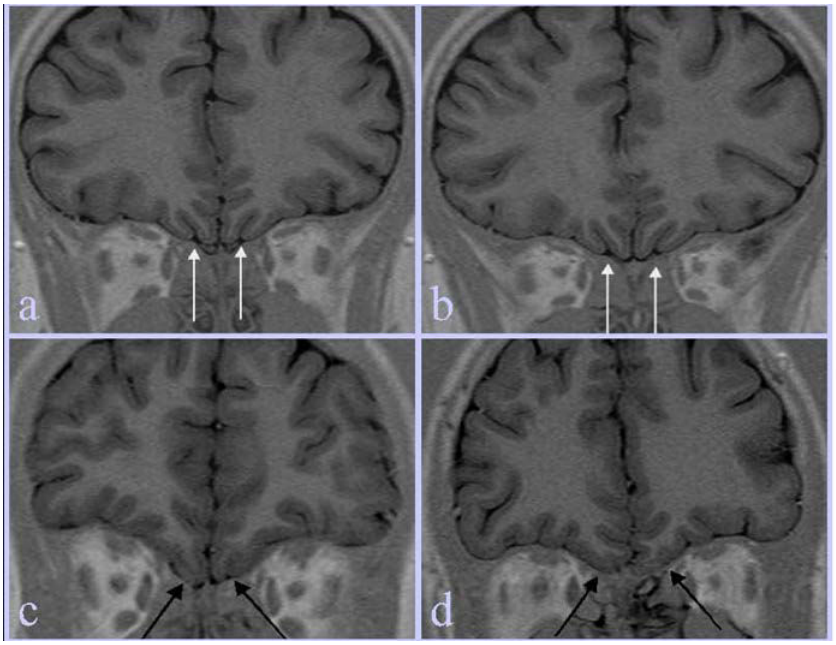


Figure 9 : IRM de la région des bulbes et sillons olfactifs.

Sujet témoin (a et b) : sillons olfactifs bien dessinés et profonds (flèche blanche)

Sujet malade (c et d) : sillons olfactifs hypoplasiques et mal dessinés (flèche noire).

D'après Malformations cranio-encéphaliques et syndrome de Kallmann-Morsier
Congrès Sfradio, 2006

Mise en évidence d'un CHH

Présentation clinique et biologique

Chez l'homme

À la naissance, le diagnostic peut être évoqué chez un garçon présentant une cryptorchidie uni ou bilatérale, ou un micropénis bien que ces signes soient très inconstants. Leur découverte peut justifier le suivi des marqueurs hormonaux pendant la période de mini puberté entre quatre et huit semaines après la naissance. En revanche, l'observation d'anomalies génitales plus profondes comme un hypospadias indique un déficit d'action ou de sécrétion des androgènes plus précoce dans la vie fœtale que celui de l'activité de la GnRH endogène.

La longueur du pénis s'accroit durant l'enfance. Les micropénis peuvent tout de même être identifiés en utilisant des référentiels sous forme de tables proposant une longueur pénienne selon l'âge (+/- une déviation standard). Les marqueurs hormonaux sont alors de peu d'aide, car l'enfance est une période d'hypogonadisme physiologique.

Le plus fréquemment, le déficit gonadotrope est découvert devant un tableau d'impubérisme partiel ou total à l'adolescence ou au début de l'âge adulte. Le diagnostic de retard pubertaire n'est évoqué qu'après l'âge de 14 ans car l'âge de démarrage de la puberté est très variable.

Il existe alors des signes cliniques évocateurs : testicules < 5 mL, pénis < 5 cm, scrotum non pigmenté et lisse, aspect eunuchoïde, morphotype féminin, pilosité axillo-pubienne absente ou réduite, absence de golfes frontaux, voix infantile, masses musculaires réduites, libido absente, retard de maturation osseuse. La moitié des patients atteints de CHH ont un syndrome de Kallmann : un défaut d'olfaction évoqué par le patient peut être un signe d'appel. L'imagerie (Imagerie par Résonnance Magnétique IRM) des bulbes olfactifs peut retrouver une hypoplasie ou une aplasie **(*Cf.* Figure 9)**. La mesure du volume testiculaire est un élément important du diagnostic ainsi que l'évaluation de la pilosité pubienne.

Figure 10 : Aspect génital d'un jeune homme atteint d'un syndrome de Kallmann à l'âge de 18 ans.

D'après Bouvattier et al., Nat. Rev. Endocrinol., 2011

Figure 11 : Aspect clinique d'une jeune femme de 22 ans atteinte de CHH consultant pour aménorrhée primaire à l'âge de 18 ans.

D'après Bry-Gauillard et al., Annales d'Endocrinologie, 2010

Lorsque le déficit gonadotrope est partiel, le volume testiculaire est plus important, compris entre 6 et 12 mL et les patients présentent souvent une virilisation modérée.

Le diagnostic n'est parfois réalisé qu'à l'âge adulte devant un aspect physique évoquant un hypogonadisme ou lors d'une consultation pour infertilité **(*Cf.* Figure 10)**.

Les marqueurs hormonaux permettent le diagnostic par l'association de gonadotrophines basses ou normales (avec les autres fonctions hypophysaires normales dans les CHH isolés) et de testostérone basse (< 2 nmol/L).

Le test à la GnRH (injection de 100 microgrammes de GnRH) peut être utilisé pour différencier une atteinte hypothalamique ou hypophysaire. L'absence de réponse des cellules gonadotropes à la GnRH permet d'identifier une cause hypophysaire. Ce test montre classiquement dans les HH une absence d'élévation ou une augmentation insuffisante de la LH et de la FSH (pic de FSH inférieur à 1,5 fois et pic de LH inférieur à 3 fois les taux de base). Néanmoins, cette exploration dynamique présente peu d'intérêt pour le diagnostic positif du déficit gonadotrope. La réponse au test est en effet très variable et dépendante de la profondeur du déficit et donc souvent difficile d'interprétation.

L'inhibine B est un marqueur du nombre de cellules de Sertoli et est corrélé au volume testiculaire. Les taux d'inhibine B sont abaissés chez les CHH et peuvent refléter la profondeur du déficit gonadotrope.

Chez la femme

À la naissance aucun signe clinique ne peut être identifié chez la petite fille.

À l'adolescence, le diagnostic de CHH est évoqué devant un développement incomplet des caractères sexuels secondaires (développement mammaire) ou dans plus de 90 % des cas par une aménorrhée primaire [11] après l'âge de 15 ans **(*Cf.* Figure 11).**

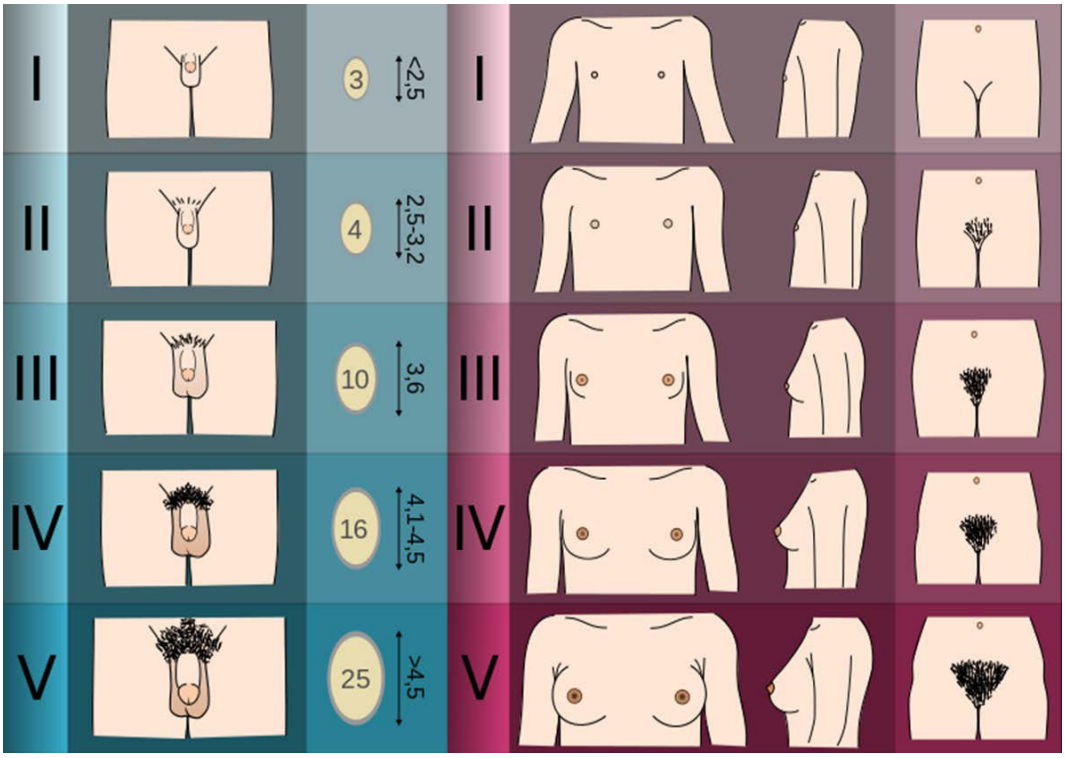


Figure 12 : Stade du développement pubertaire selon Tanner.
Chez l'homme : Pilosité pubienne [P]
Chez la femme : développement des Seins [S] et pilosité Pubienne [P].

À l'âge adulte, les motifs de consultation sont souvent identiques à ceux de l'adolescence. Néanmoins certaines patientes consultent pour infertilité ou même des fractures ostéoporotiques.

La détermination du stade de Tanner **(*Cf.* Figure 12)** doit être systématique, car elle permet d'établir un élément de référence pour le suivi chez de ces patients.

Les marqueurs hormonaux sont les mêmes que chez l'homme à l'exception bien entendu du dosage de la testostérone totale et de l'inhibine B. Le taux d'œstradiol est souvent bas voire indétectable et est corrélé au développement mammaire.

Diagnostic différentiel

Retard pubertaire simple

Les retards pubertaires simples (RPS) sont plus fréquents dans la population masculine et se définissent comme une absence de développement pubertaire après l'âge de 14 ans. La prévalence du retard pubertaire chez le garçon est d'environ 2 % à 14 ans et il s'agit du principal diagnostic différentiel avec les CHH.

Jusqu'à l'âge de 18 ans, il existe peu d'arguments cliniques ou paracliniques permettant de différencier le RPS des CHH. En effet, le RPS est un diagnostic d'élimination et seule l'apparition de signes de virilisation permet de l'affirmer définitivement. Cliniquement, il faut connaitre les signes d'appel évoquant un CHH : cryptorchidie et micropénis, car ils sont rarement associés à un RPS. D'autres éléments doivent être recherchés afin de mettre en évidence un syndrome de Kallmann (anosmie, syncinésie, anomalie urogénitale, surdité, fente labio-palatine …) ou une éventuelle forme syndromique. Avant l'âge de 18 ans, il n'existe pas d'exploration hormonale permettant de trancher entre CHH et RPS. L'âge osseux, classiquement retardé dans le RPS, n'est pas non plus contributif, car il peut aussi l'être chez certains patients atteints de CHH.

Hypogonadismes hypogonadotropes fonctionnels

Le déficit nutritionnel peut entrainer un HH dit « fonctionnel ». Il constitue chez la jeune femme un diagnostic différentiel difficile notamment avec les nCHH lorsqu'aucune mutation n'a pu être identifiée. Le tableau clinique sera alors identique : HH sans anosmie, IRM hypophysaire et des bulbes olfactifs normaux, associés à une aménorrhée ou oligoménorrhée. Il faudra alors éliminer par un interrogatoire rigoureux et l'examen clinique une cause fonctionnelle : recherche de restriction alimentaire ou d'une activité physique intense, éliminer une maladie chronique, calcul de l'indice de masse corporelle et évaluation de la masse grasse.

Hypogonadismes hypogonadotropes acquis

Les déficits acquis en GnRH sont dominés par les syndromes tumoraux et infiltratifs. Les maladies chroniques et les traumatismes crâniens sont également des causes de CHH [12–15]. L'ensemble des fonctions hypophysaires chez les patients suspects de CHH doit être évalué afin de ne pas méconnaitre une cause acquise d'HH. L'IRM de la région hypothalamo-hypophysaire permet d'écarter une masse ou une infiltration de la région hypophysaire.

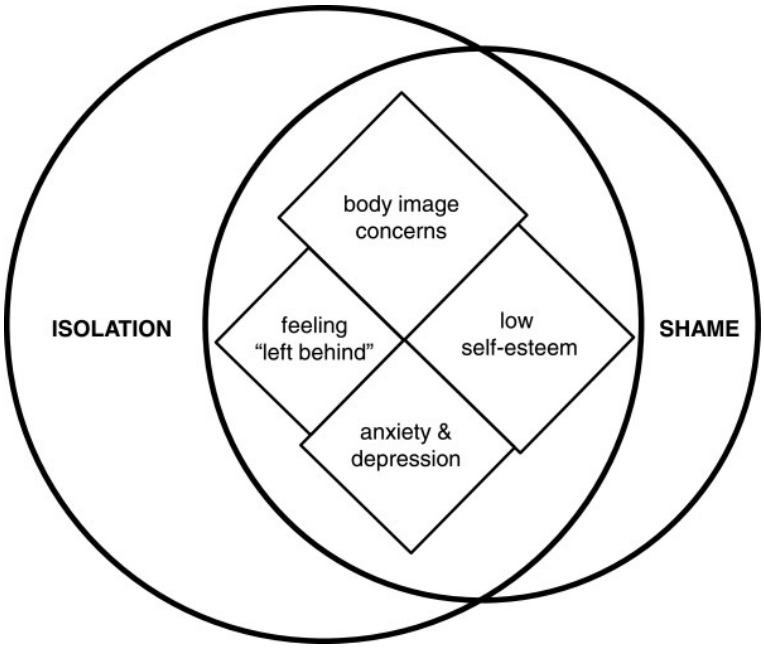


Figure 13 : Principales difficultés vécues et rapportées par des patients atteints de CHH nécessitant une prise en charge médicale.
Les deux grands sentiments rapportés par les patients sont les sentiments de honte et d'isolement. Ces deux grandes préoccupations comprennent toutes deux, quatre problèmes constamment évoqués et intriqués ; faible estime de soi, image du corps déformée, sentiment d'être délaissé et les problèmes liés à l'anxiété et à la dépression. La taille des cercles et des diamants sont fonction de la fréquence des commentaires. Les contacts et les chevauchements représentent les thèmes évoqués en même temps par les mêmes patients.

D'après Dwyer et al., Orphanet J. Rare Dis., 2014

Traitement

Les objectifs des traitements des CHH sont 2 types :

Permettre le développement des caractères sexuels secondaires masculins ou féminins.

En effet, la 1ère cause de consultation des adolescents masculins atteints de CHH est l'absence de virilisation. Le manque de libido et l'impuissance font également partie des difficultés rencontrés par les patients. Pour les sujets CHH de sexe féminin, l'absence de développement mammaire et l'aménorrhée sont les causes principales de consultation dans l'adolescence. De plus, les patients atteints de CHH souffrent souvent également d'une faible estime d'eux-mêmes, d'une image déformée de leur corps, d'un développement psychosexuel altéré avec même parfois jusqu'à des problèmes d'identité sexuelle [16,17]. De plus, il semblerait d'après des études incluant un faible de nombre de patients, qu'ils soit sujets à des risques accrus d'anxiété et de dépression [18,19] **(*Cf.* Figure 13)**.

Restaurer la fertilité.

À l'âge adulte la demande des patients atteints de CHH peut être liée à la réalisation d'un projet parental. Des traitements efficaces pour induire la fertilité existent pour ces patients mais font apparaitre la problématique de la transmission de mutations et d'un conseil génétique qui peut se révéler ardu étant donné la complexité de certains génotypes et surtout de l'expressivité très variable de la maladie.

Développement des caractères sexuels secondaires durant l'enfance

Chez le garçon, il est important de traiter la cryptorchidie, si elle est présente, par la chirurgie dans la première année de vie afin de préserver un futur potentiel de fertilité (et éviter un risque tumoral). Les micropénis peuvent être traités par de faibles doses de testostérone (localement) pour agrandir la taille du pénis, sur une courte durée pour éviter le développement de caractères sexuels secondaires. Les gonadotrophines peuvent également être utilisées. Plus contraignant, ce dernier traitement pourrait avoir l'avantage de stimuler les tissus gonadiques en « mimant » une mini-puberté et faciliterait par la suite l'induction de la puberté à l'adolescence [20].

Développement des caractères sexuels secondaires durant l'adolescence et l'âge adulte

Chez l'adolescent ou l'adulte jeune, le principal objectif thérapeutique est l'acquisition des caractères sexuels secondaires permettant de développer un aspect physique et comportemental similaire à ceux des patients de même âge. Le but est également de favoriser la croissance staturale, d'améliorer le gain de masse osseuse, mais également de préserver l'image de soi et le bien-être.

Pour atteindre ces objectifs, plusieurs possibilités thérapeutiques existent : les stéroïdes (administrés per os, par voie sous-cutanée ou en intramusculaire), les gonadotrophines, ou encore l'administration de GnRH pulsatile à l'aide d'une pompe portable.

Chez le garçon, afin d'obtenir un développement du volume testiculaire, certaines équipes, ont recours à l'administration de GnRH ou à un traitement combiné par les gonadotrophines FSH et hCG. Ce type d'approche thérapeutique permettrait d'améliorer ultérieurement le pronostic de fertilité par une maturation plus «physiologique» de la gonade.

Induction de la fertilité chez l'homme

La réussite de la restauration de la fertilité chez les hommes atteints de CHH dépend du stade de développement testiculaire atteint par l'individu. Ceci souligne l'importance des traitements pouvant être entrepris dans l'enfance et dans l'adolescence. En effet la cryptorchidie, un volume testiculaire prépubertaire < 4mL et des taux d'inhibine B bas sont des facteurs prédictifs péjoratifs pour l'induction de la fertilité [21–23].

Plusieurs traitements sont possibles pour stimuler la spermatogénèse. De façon classique les gonadotrophines sont utilisées en injection 2 à 3 fois par semaine en combinant FSH et human Chorionic Gonadotrophin (hCG). Il est également possible d'avoir recours à une pompe portable délivrant de la GnRH de façon pulsatile. Ces deux options permettent d'induire à la fois la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig et la spermatogénèse en 3 à 6 mois. Afin d'induire une spermatogénèse, un traitement sur une période supérieure à 12 mois et jusqu'à 24 mois est parfois nécessaire. L'objectif n'est pas celui de la restauration d'une spermatogénèse normale mais l'obtention d'une grossesse chez la partenaire. Une cryopréservation du sperme doit être proposée pour éviter la répétition de ces protocoles lors d'un nouveau projet de grossesse.

Induction de la fertilité chez la femme

L'infertilité chez les femmes atteintes de CHH est due à l'incapacité de maturation des follicules en l'absence de gonadotrophines circulantes, ayant pour conséquence une anovulation. La restauration de la sécrétion des cellules gonadotropes par traitement inducteur permet l'ovulation avec un bon taux de réussite car la réserve ovarienne chez ces patients est intacte. Le traitement peut être l'administration pulsatile de GnRH ou bien une injection quotidienne de FSH pour préparer les follicules. En cas de déficit gonadotrope complet, une supplémentation en LH est indispensable pour assurer la production d'androgènes par les cellules de la thèque et donc d'œstradiol par le follicule dominant. L'élévation de l'œstradiol favorise le développement suffisant de l'endomètre et prépare la nidation de l'embryon. Cette

Table 4 | Approach to treatment of CHH

Target population	Goals	Treatment	Clinical monitoring	Laboratory monitoring	Comments
Neonatal and childhood					
Male individuals with cryptorchidism with or without micropenis	Testicular descent	Cryptorchidism: orchidopexy (patients aged <1 year)	Testicular volume	Testosterone, LH, FSH, inhibin B and AMH levels	Baseline levels of testosterone, LH and FSH between days 14–90; for later timepoints, measure after GnRH agonist stimulation No current indication for female individuals
	Penis growth	Micropenis: testosterone, DHT or gonadotropin therapy (patients aged 1–6 months)	Penile growth		
Adolescent					
Patients aged 14–15 years (earlier in the presence of specific signs such as anosmia)	Virilization or estrogenization Sexual function Growth and bone health Gonadal maturation and future fertility Psychological wellbeing	Male patients: testosterone (oral, injectable or transdermal) Gonadotropins?	Genital development Growth and epiphyseal closure Virilization Sexual function Wellbeing Adherence Reversibility	Morning serum testosterone levels (trough levels for injections), LH, FSH and inhibin B levels, haemocrit	Testosterone treatment will not induce testicular growth or fertility
		Female patients: estradiol (oral or transdermal) followed by estradiol + progesterone or progestin	Breast development Growth and epiphyseal closure Estrogenization Feminized body Menses Sexual function Bone health Wellbeing Adherence Reversibility	No specific	Estradiol must be increased slowly before the combination of estradiol + progesterone or progestin to maximize breast development and avoid areolar protrusion
Adulthood					
All patients	Sexual function Fertility Limiting comorbidities Psychological wellbeing Puberty induction	Male patients: Testosterone (injectable or transdermal) hCG ± FSH FSH, FSH + hCG GnRH pump	Pubertal development Sexual function and libido Bone health Wellbeing Adherence Fertility Reversibility	Tough serum testosterone levels, LH, FSH and inhibin B levels, haematocrit, PSA levels	Sex steroid replacement will not induce fertility
		Female patients: Estradiol (oral or transdermal) Progesterone or progestin FSH + hCG or GnRH pump	Pubertal development Sexual function and libido Bone health Wellbeing Adherence Fertility Reversibility	Serum levels of estradiol, LH, FSH, inhibin B and AMH	Sex steroid replacement will not induce fertility

Abbreviations: AMH, anti-Müllerian hormone; CHH, congenital hypogonadotropic hypogonadism; DHT, dihydrotestosterone; FSH, follicle-stimulating hormone; GnRH, gonadotropin-releasing hormone; hCG, human chorionic gonadotropin; LH, luteinizing hormone; PSA, prostate-specific antigen.

Figure 14 : Récapitulatif des objectifs et des traitements dans l'enfance, l'adolescence et l'âge adulte.

D'après Boehm et al., Nat Rev Endocrinol., 2015

phase est suivie d'une injection de LH ou hCG pour déclencher l'ovulation. Après l'ovulation, la production de progestérone par le corps jaune, jusqu'à la production suffisante d'hCG par l'embryon lui-même, est induite par injections d'hCG répétées. Alternativement, une administration de progestérone per os peut être conduite.

L'ensemble des modalités de traitement est résumé dans la figure 14.

Étiologies génétiques des CHH

On considère classiquement que les formes syndromiques sont dues à des anomalies du développement [24,25] alors que les nCHH seraient essentiellement dus à des défauts de signalisation hormonale par altération des hormones ou des récepteurs hormonaux de l'axe gonadotrope. Les facteurs responsables de ces anomalies (à l'exception de la GnRH et de son récepteur, candidats évidents) ont été identifiés à la suite d'études génétiques en pathologie humaine. L'identification des gènes détaillés ci-dessous a permis d'ouvrir un nouveau champ de recherche en physiologie pour lequel l'étude de modèles animaux a été déterminante en raison de la plus grande accessibilité à l'expérimentation des tissus de l'axe hypothalamo-hypophysaire à chaque âge de son développement.

Hypogonadismes hypogonadotropes sans anosmie

GNRHR

Le gène *GNRHR* (4q13.2-3) code le récepteur de la GnRH. C'est une protéine de 328 acides aminés (AA) faisant partie de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine g trimérique. Ce récepteur présente une extrémité N-terminale (N-ter) extracellulaire mais pas de queue C terminal (C-ter) intracellulaire. La liaison du ligand endogène GnRH (codé par *GNRH1*) active la phospholipase C, provoquant une augmentation de la production d'inositol triphosphate (IP3) et la mobilisation du calcium intracellulaire [26].

Les premières mutations du gène *GNRHR* ont été décrites par de Roux et al. (1997). À ce jour, environ vingt mutations de *GNRHR* ont été rapportées à l'état homozygote ou hétérozygote composite chez des patients atteints de formes sporadiques ou familiales de nCHH, selon un mode de transmission autosomique récessif [27–35]. Des études sur de larges cohortes ont révélé que les mutations *GNRHR* représentent 3,5 à 16 % des cas sporadiques de nCHH et jusqu'à 40 % des cas familiaux de nCHH [36].

Les mécanismes responsables des nCHH sont des pertes de fonction du récepteur et procèdent de défauts dans la synthèse, dans le trafic vers la membrane cellulaire et/ou l'internalisation, le recyclage ou la dégradation des récepteurs, d'altération de la liaison du ligand ou de la transduction du signal. Ces pertes de fonctions partielles ou totales provoquent une insuffisance plus ou moins profonde de sécrétion des gonadotrophines [37]. Le spectre phénotypique des patients atteints de nCHH avec des mutations *GNRHR* varie d'un hypogonadisme partiel à complet [29,32,38,39]. Il a été décrit des patientes atteintes d'hypogonadisme complet ne répondant pas au traitement par administration pulsatile de GnRH [28], alors que les patientes dont l'atteinte est partielle présentaient des réponses dose-dépendantes à la GnRH pulsatile en termes de sécrétion des gonadotrophines et de l'ovulation [30,40]. De plus, des patients de sexe masculin portant des mutations perte de fonction partielle du récepteur à l'état homozygote et présentant un retard de croissance et de puberté avec une oligospermie ont été signalés [41]. Pitteloud et al. (2001) [39] ont rapporté l'inversion spontanée de l'HH chez un patient porteur d'une mutation homozygote dans le récepteur de la GnRH.

GNRH1

Étant donné le rôle central de la GnRH dans la reproduction humaine, le gène qui code la GnRH était un candidat évident pour expliquer les nCHH. Cependant, malgré les efforts de plusieurs équipes, aucune modification génétique n'avait été rapportée dans ce gène chez les patients avec un nCHH jusqu'en 2009 lorsque deux groupes indépendants ont rapporté des mutations homozygotes décalant le cadre de lecture de *GNRH1* chez des patients nCHH.

Bouligand et al. (2009) [42] ont rapporté la première mutation homozygote, codant le peptide signal de *GNRH1* (c.30dup) dans la région amino-terminale du précurseur de la protéine chez deux frères et sœurs de 17 et 18 ans atteints de nCHH complet (micropénis / aménorrhée primaire et absence de développement mammaire). Le décalage du cadre de lecture provoque un changement sur les 36 acides aminés après la position 11 et fait disparaitre la séquence du décapeptide actif GnRH **(*Cf.***

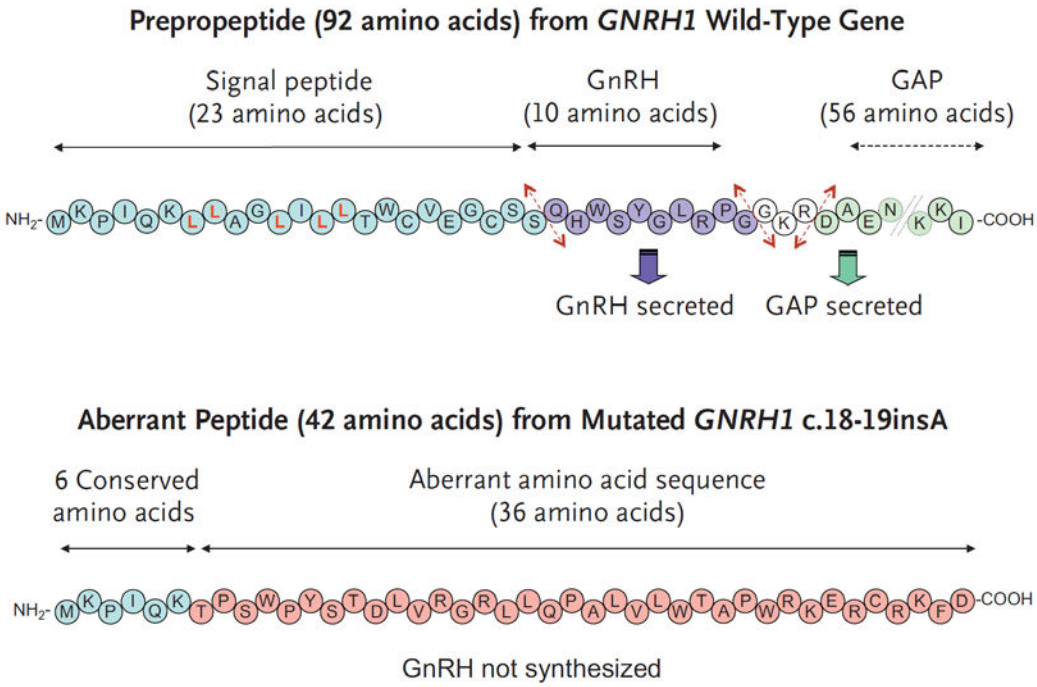


Figure 15 : Séquence peptidique du prépropeptide Wild-type de la GnRH (92 AA) et du peptide muté putatif (42 AA).

D'après Bouligand et al., NEJM, 2009

Figure 15). L'absence de sécrétion de GnRH a été confirmée par transfection du mutant dans des cellules exprimant les proconvertases.

Leurs parents et la sœur, hétérozygotes simples, n'avaient aucun phénotype particulier sur le plan endocrinien ce qui suggérait une transmission autosomique récessive.

De façon intéressante, la pulsatilité de la LH endogène a pu être restaurée par l'administration de GnRH chez la sœur atteinte, ce qui suggère une origine hypothalamique du déficit en gonadotrophine et la conservation de la capacité d'être stimulées, des cellules gonadotropes hypophysaires. Aucune autre mutation dans le gène *GNRH1* n'a pu être identifiée chez 145 patients sporadiques atteints de nCHH dans cette étude.

Dans une autre étude [43], 310 patients atteints de nCHH ont été analysés. Un jeune homme de 15 ans présentait une autre mutation frameshift (c.87delA) à l'état homozygote. Il présentait un micropénis, une cryptorchidie bilatérale et une absence de développement pubertaire à 15 ans. De plus, quatre variants rares ont été identifiés à l'état hétérozygote chez d'autres patients atteints de nCHH.

Depuis, en 2013, Maione et al. [44] ont effectué une analyse fonctionnelle du variant R31C (p.Arg31Cys) à l'état hétérozygote identifié à neuf reprises chez des patients atteints de nCHH. Cette analyse a permis de montrer une perte de fonction partielle du décapeptide muté mais pas d'effet dominant négatif confortant une transmission apparemment dominante chez les quatre familles étudiées et apportant un argument fort pour impliquer ce variant dans le phénotype nCHH. Ces résultats peuvent suggérer des mécanismes plus complexes de l'action de la GnRH et / ou une participation de mutations de gènes encore inconnus.

Le grand nombre de patients séquencés dans ces études suggère que les mutations de *GNRH1* sont des causes génétiques très rares de CHH.

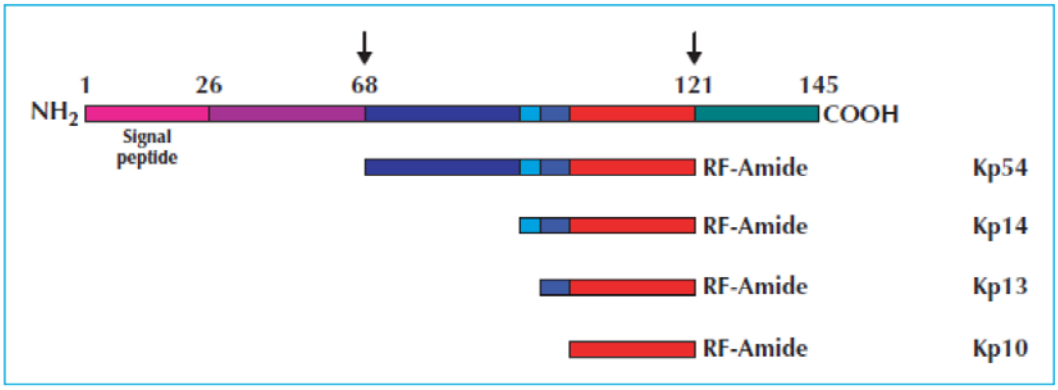


Figure 16 : Structure des kisspeptines.

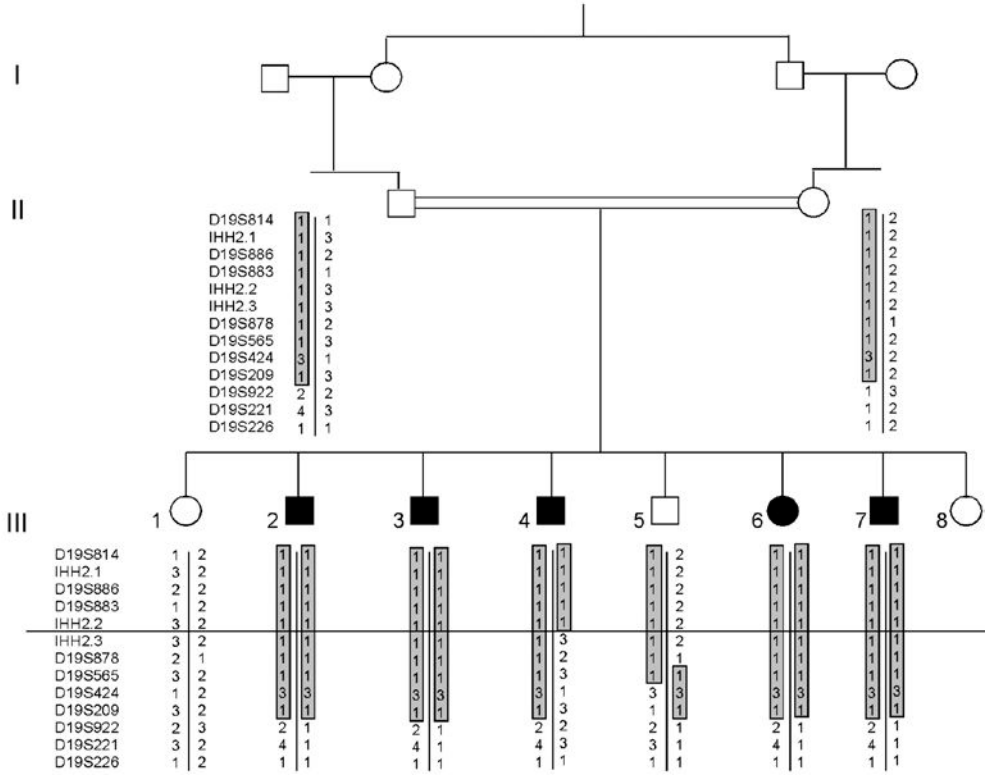


Figure 17 : Génotypage et établissement des haplotypes ayant permis de situer le locus 19p13 lié au nCHH dans une famille consanguine.
L'haplotype commun aux deux parents est représenté par le cadre gris.

D'après de Roux et al., PNAS, 2003

KISS1R

Au cours des dernières années, la signalisation par les Kisspeptines et leur récepteur (*KISS1R* anciennement appelé *GPR54*) a été démontrée comme essentielle à la fonction reproductive [45,46].

Le gène *KISS1* (1q32.1) a été identifié en 1996 (nommé alors « metastatin ») comme gène suppresseur de métastases dans des cellules de mélanome[47]. Ce gène code un pré-pro-peptide de 145 acides aminés (AA) et par protéolyse différentes kisspeptines (Kp) de taille variant entre 54 et 10 AA (Kp-54, Kp-14, Kp-13 et Kp-10) sont obtenues. À l'extrémité C-terminale (C-Term), une séquence de 10 AA RF-amide (Arg-Phe-NH2) est présente dans tous les peptides matures isolés et constitue la séquence minimale nécessaire à une bioactivité **(*Cf.* Figure 16)**.

Le gène *KISS1R* (19p13.3) code un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines g de 398 AA [48]. La liaison des ligands Kisspeptines à leur récepteur KISS1R permet le couplage à la protéine Gq, permettant l'activation de la phospholipase C et conduit à une augmentation de la production de IP3 et de mobilisation du calcium intracellulaire [49–52].

En 2003, deux groupes indépendants ont identifié une nouvelle région candidate sur le bras court du chromosome 19 en utilisant des approches d'analyse de liaison sur deux grandes familles consanguines comprenant plusieurs patients atteints de nCHH [53,54] **(*Cf.* Figure 17)**.

Le séquençage de plusieurs gènes candidats dans cette région, a permis d'identifier des mutations perte de fonction à l'état homozygote dans le gène *KISS1R* chez les patients atteints. Dans les deux études, l'analyse de la ségrégation familiale des mutations a montré que les porteurs hétérozygotes des mutations *GPR54* avaient un développement pubertaire normal, ce qui démontre un mode autosomique récessif.

Depuis d'autres patients portants des mutations de *KISS1R* ont été décrites. Ils présentaient des CHH de gravité variable mais toujours sans anosmie ni autres pathologies associées. Le cas présentant le phénotype le plus modéré de nCHH

rapporté dans la littérature est un patient hétérozygote composite [54]. Il présentait un HH partiel avec des concentrations de testostérone et de gonadotrophines basses mais conservait une sécrétion de faible amplitude de la LH endogène. Le phénotype le plus sévère de nCHH rapporté [55] est un patient, lui aussi hétérozygote composite, présentant un micropénis, une cryptorchidie bilatérale et des gonadotrophines indétectables.

Dans le système nerveux central, l'expression des Kisspeptines est la plus élevée dans les noyaux arqué (ARC) et périventriculaire antéroventral (AVPV). Les neurones de ces noyaux ont des projections dans la zone préoptique médiane, où sont concentrés les neurones à GnRH. Le récepteur KISS1R est notamment exprimé à la surface des neurones GnRH [56]. Des études physiologiques et pharmacologiques menées chez l'homme et des modèles animaux ont démontré que la Kisspeptine est le plus puissant stimulateur connu de la sécrétion de LH dépendant de la GnRH [57]. De faibles doses de Kisspeptine, administrées à des rongeurs, des primates ou des humains, de façon centrale ou périphérique, sont en effet capables de déclencher une forte sécrétion de gonadotrophines [58–64].

De plus en 2012, l'équipe de Topaloglu [65] a rapporté la première mutation homozygote inactivatrice de *KISS1,* le gène codant les Kisspeptines, dans une grande famille consanguine, mutation associée à un nCHH apportant donc la preuve formelle que ce gène candidat évident est indispensable à la mise en place de la puberté et à la fonction de reproduction chez l'Homme.

Les modèles animaux ont permis de localiser les neurones exprimant la Kisspeptine et son récepteur. Les animaux Knockout (KO) pour le récepteur ont permis de reproduire le phénotype de nCHH mais de grosses différences sur le plan anatomique et dans le déclenchement de la puberté de ces animaux rendent difficiles la transposition de ces résultats et la compréhension du rôle exact de cette voie de signalisation chez l'Homme [58,66–71].

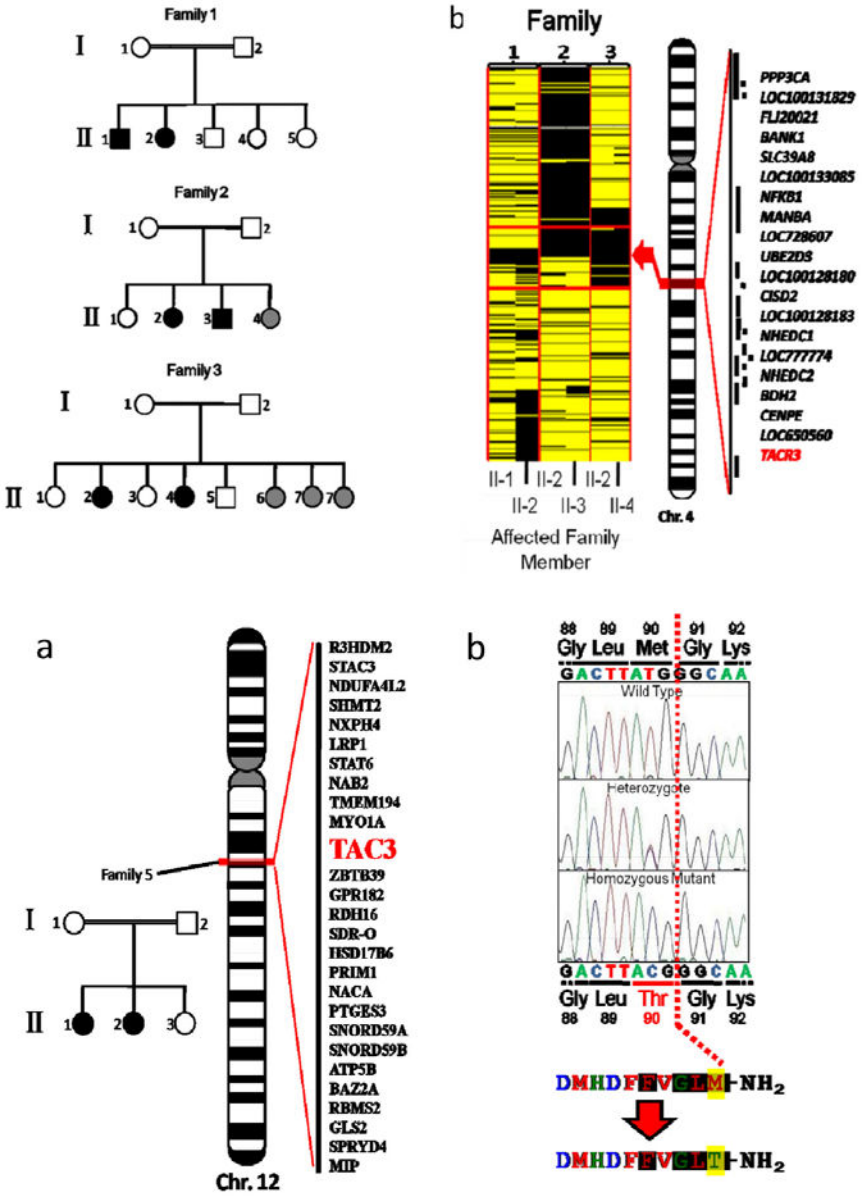


Figure 18 : Familles nCHH ayant permis l'identification de *TACR3* par analyses de liaison d'après les données de puces SNPs.

D'après Topaloglu et al., Nat Genet, 2009

TAC3/TACR3

La Neurokinine B est un décapeptide apparenté aux tachykinines fortement exprimé dans le noyau arqué de l'hypothalamus [72]. Par analyse de liaison sur puces SNP de quatre familles turques consanguines non apparentées comportant plusieurs cas de nCHH, Topaloglu et al. (2009) [73] ont identifié des mutations perte de fonction à l'état homozygote des gènes *TAC3* (12q13.3) et *TACR3* (4q24), codant respectivement la Neurokinine B et son récepteur **(*Cf.* Figure 18)**. La transmission décrite correspond à un mode autosomique récessif. Cette publication a permis d'impliquer la voie de la Neurokinine B dans l'axe reproductif humain après démonstration de la perte de fonction du ligand ou du récepteur muté par analyse fonctionnelle *in vitro* [73].

Les patients décrits présentaient des gonadotrophines faibles ou effondrées. Tous les patients de sexe masculin présentaient un micropénis, suggérant un défaut d'activation fœtale et périnatale de l'axe gonadotrope. Cette première description a ensuite été confirmée par d'autres publications [74]. Néanmoins, une controverse existe sur le rôle de cette voie de signalisation dans le déclenchement de la puberté et de son maintien à l'âge adulte, des cas de patients nCHH au phénotype réversible à l'âge adulte ayant été décrits [75].

Le mécanisme par lequel le système Neurokinine B exerce ses effets neuroendocriens sur le contrôle central de la reproduction reste largement à explorer. Chez les rongeurs, l'expression de la Neurokinine B est juxtaposée aux axones des neurones à GnRH au sein de l'éminence médiane. De plus, les récepteurs de la Neurokinine B ont été identifiés sur les neurones à GnRH, suggérant un rôle au niveau de la libération de GnRH hypothalamique [76]. En outre, la Neurokinine B et son récepteur sont co-exprimés dans les neurones qui expriment également la Kisspeptine et la Dynorphine, deux autres neuropeptides [72].

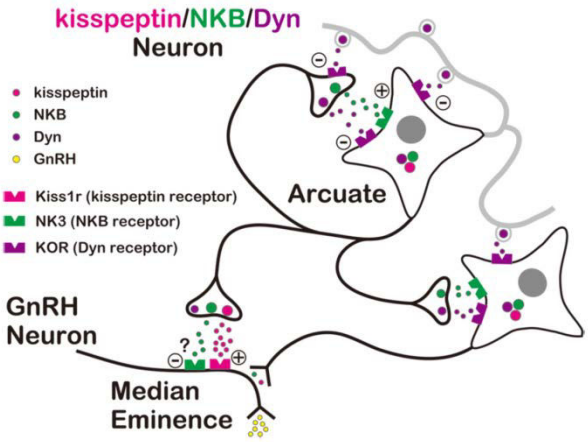


Figure 19 : Proposition de modèle pour la génération d'une activité rythmique des neurones KNDy dans le noyau arqué de l'hypothalamus permettant la pulsatilité de la sécrétion de GnRH au niveau de l'éminence médiane.

Abréviations : Arcuate (Noyau arqué de l'hypothalamus), Median eminence (éminence médiane).

Modèle proposé à partir de la physiologie de la souris et de la chèvre.

La voie de la Neurokinine B jouerait un rôle d'accélérateur tandis que la Dynorphine jouerait un rôle de frein sur l'activité des neurones KNDy (sécrétant Kisspeptine, Neurokinine B et Dynorphine) par un réseau de signalisation autocrine et paracrine.

D'après Navarro et al., JNEUROSCI., 2009 et Wakabayashi et al., JNEUROSCI., 2010

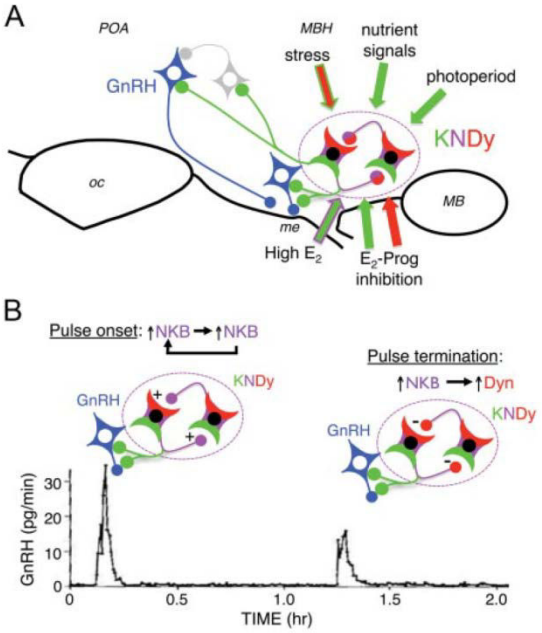


Figure 20 : Modulation des neurones KNDy et Théorie du générateur de pulsatilité hypothalamique

[A] Schéma montrant les différents signaux régulateurs potentiels convergeant vers les neurones KNDy. En plus des contacts directs vers les neurones à GnRH, des contacts indirects par des interneurones (en gris) sont possibles.

[B] Modèle théorique par lesquels la synchronisation entre les neurones KNDy pourrait réguler la sécrétion pulsatile de la GnRH.

Abréviations : MB, Mammillary bodies; me, median eminence; oc, optic chiasm; Prog, progesterone.

D'après Lehman et al., Endocrinology, 2010

Théorie du générateur de pulsatilité hypothalamique

Il existe un sous-groupe de neurones appartenant au noyau arqué de l'hypothalamus, les neurones KNDy, qui ont la particularité d'exprimer trois neuropeptides : la kisspeptine, la neurokinine B et la dynorphine. Leur identification a permis de dégager un nouveau modèle de contrôle de la libération de la GnRH au niveau hypothalamique, en plaçant les neurones KNDy au centre du système régulateur des neurones à GnRH. En 2009 et 2010, les équipes de Navarro et al.[77] puis de Wakabayashi et al. [78] ont postulé que différents peptides, la Neurokinine B et la Dynorphine, interagissaient eux-mêmes avec leurs récepteurs situés sur les neurones KNDy, de façon autocrine et paracrine. Cette signalisation double, accélératrice et freinatrice, crée un circuit rythmique de l'activité de secrétion de la Kisspeptine par le neurone KNdy **(*Cf.* Figure 19)**. La Kisspeptine est ainsi sécrétée par « burst » (Phase de sécrétion à la fréquence élevée suivie d'une pause) et régule la sécrétion pulsatile de la GnRH au niveau de l'éminence médiane en se fixant sur le récepteur KISS1R localisé à la membrane des neurones à GnRH.

Ces neurones KNDy pourraient également être la cible des facteurs régulateurs de l'axe gonadotrope tels que le rétrocontrôle par l'œstradiol [79] ou la progestérone [80,81] **(*Cf.* Figure 20)** et influencer d'autres systèmes physiologiques (masse [79] ou température corporelle[82]). La généralisation de ces effets mis en évidence chez l'animal est difficile et ils pourraient n'être qu'espèces spécifiques [78,83–90] selon qu'il s'agisse d'espèces à reproduction saisonnière, d'oiseaux, de murins, d'ovins ou de primates.

Syndrome de Kallmann

Le syndrome de Kallmann, caractérisé par la combinaison de CHH avec une anosmie ou hyposmie, est une maladie génétique dont la prévalence est estimée à 1 / 10.000 hommes et 1 / 50.000 femmes [91]. En 1944, la nature héréditaire de cette maladie a été démontrée par Kallmann et al. (1944). Plus tardivement, de Morsier (1954) [92] a pu consolider la description de la pathologie par des données issues d'autopsies sur l'atrophie génitale et l'agénésie des bulbes olfactifs chez l'homme.

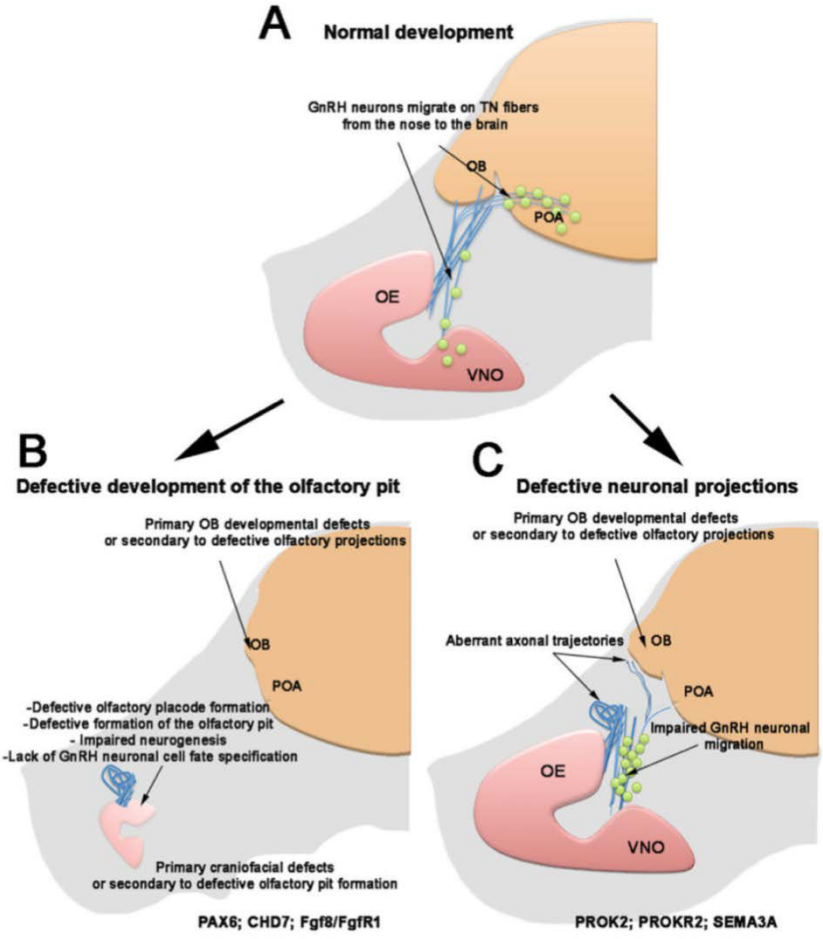


Figure 21 : Physiopathologie du syndrome de Kallmann.
Schéma de l'embryon murin
[A] Projections neuronales normales : les fibres voméro-nasales / terminales (en bleu) en provenance de épithélium olfactif (OE) et de l'organe voméro-nasal (VNO) font contact avec les bulbes olfactifs (OB). Les neurones à GnRH (en vert) migrent le long de la fibre terminale vers l'aire préoptique de l'hypothalamus (POA) .
[B et C] Deux schémas de développement pathologique [B] Modèle murin avec défaut de formation des sillons olfactifs et absence de développement des neurones à GnRH.
[C] Modèle murin avec anomalies de formation ou d'orientation des projections nerveuses qui affectent la migration des neurones à GnRH.
D'après Forni et al., Front. Neuroendocrinol ,2014

Bien que la plupart des cas de syndrome de Kallmann soient sporadiques, des cas de transmission autosomique dominante liée à l'X et de transmission autosomique récessive ont été décrits [93,94]. Dans le syndrome de Kallmann, l'anosmie est liée à une hypoplasie ou aplasie des bulbes olfactifs, alors que l'hypogonadisme est du à un défaut de signalisation de la GnRH, dont le mécanisme maintenant bien accepté est la migration anormale des neurones à GnRH. Chez la plupart des vertébrés, les neurones olfactifs et les neurones à GnRH ont une origine embryonnaire commune dans la placode nasale et migrent ensemble à travers la plaque criblée vers le bulbe olfactif, expliquant l'association de l'HH avec des anomalies olfactives [24,95] **(*Cf.* Figure 21)**. Plusieurs gènes ont été identifiés dans le syndrome de Kallmann codant pour différents acteurs des mécanismes de migration.

KAL1

L'identification du gène *KAL1* (Xp22.3) a été réalisée dans le cadre de la recherche des causes génétiques de syndromes de gènes contigus dont le syndrome de Kallmann [96].

Ce gène code une protéine extracellulaire de 680 acides aminés appelée anosmine-1, qui contient un domaine contenant huit cystéines reliées par des ponts disulfures et quatre domaines fibronectine de type III qui sont homologues aux molécules d'adhérence, et plusieurs sites de liaison au sulfate d'héparine (HS) [97,98]. L'anosmine-1 est impliquée dans le contrôle de différentes fonctions cellulaires dont l'adhérence cellulaire, l'élongation et la fasciculation des neurites et axones, la morphogenèse épithéliale, ainsi que dans l'activité migratoire des neurones à GnRH [99–102]. Au cours du développement, l'anosmine-1 est exprimée dans la membrane basale du bulbe olfactif, de la rétine et du rein [103,104].

Des mutations *KAL1* de tous types (faux-sens, non-sens, mutations de site d'épissage, microdélétions d'exons, délétions de grandes taille) ont été rapportées [105,106]. Le phénotype des patients décrits mutés *KAL1* est généralement sévère et la pénétrance de la pathologie dans les cas familiaux est élevée mais l'expression est variable [107,108]. Les patients atteints du syndrome de Kallmann lié au chromosome X présentent en effet souvent un micropénis et une cryptorchidie à la naissance,

témoins du déficit en gonadotrophines pendant le développement fœtal et périnatal [107]. D'autres anomalies sont fréquemment associées au syndrome de Kallmann du à des mutations *KAL1* : palais ogival, fente labiale et/ou palatine, métacarpes courts, agénésie rénale unilatérale, perte auditive neurosensorielle, syncinésie d'imitation et des anomalies oculomotrices [109–111].

FGFR1

Le gène *FGFR1* (8p11.2) a également été identifié sur l'hypothèse de syndrome de gènes contigus chez des patients atteints du syndrome de Kallmann [112,113]. Dode et al. (2003) [112] ont rapporté les premiers des mutations perte du récepteur des facteurs de croissance des fibroblastes 1 (FGFR1) pour la forme autosomique dominante du syndrome de Kallmann. Depuis la prévalence des mutations *FGFR1* a été évaluées à environ 10-17% des syndromes de Kallmann [105,106]. Les patients mutés *FGFR1* présentent une particulièrement grande variabilité phénotypique extra- et même intra-familiale pour une même mutation avec notamment une pénétrance incomplète. Les patients porteurs de mutations *FGFR1* peuvent présenter un syndrome de Kallmann, un HH isolé, une anosmie isolée, ou bien encore aucune des deux caractéristiques voire aucun phénotype. En dehors du CHH et des défauts olfactifs, chez ces patients il est également décrit des fentes palatines et/ou labiales, des agénésies dentaires, des malformations des mains et des pieds et, plus rarement des syncinésies [105–107]. Il faut également souligner la description de patients expérimentant une réversibilité du phénotype HH après l'arrêt d'un traitement androgénique avec une fonction reproductive restaurée [108,114]. Cette observation conduit en pratique clinique à évaluer régulièrement la fonction reproductive des patients sous traitement. Le récepteur FGFR1 appartient à la famille des récepteurs du facteur de croissance fibroblastique (FGF). Il comporte trois domaines extracellulaires de type Immunoglobuline, un domaine transmembranaire, et deux domaines intracellulaires à tyrosine kinase. Ce récepteur est exprimé dès le développement embryonnaire dans de nombreux tissus notamment le squelette, l'oreille interne, et l'encéphale [115,116]. Sa signalisation nécessite une dimérisation après liaison au ligand (FGFs) et le domaine

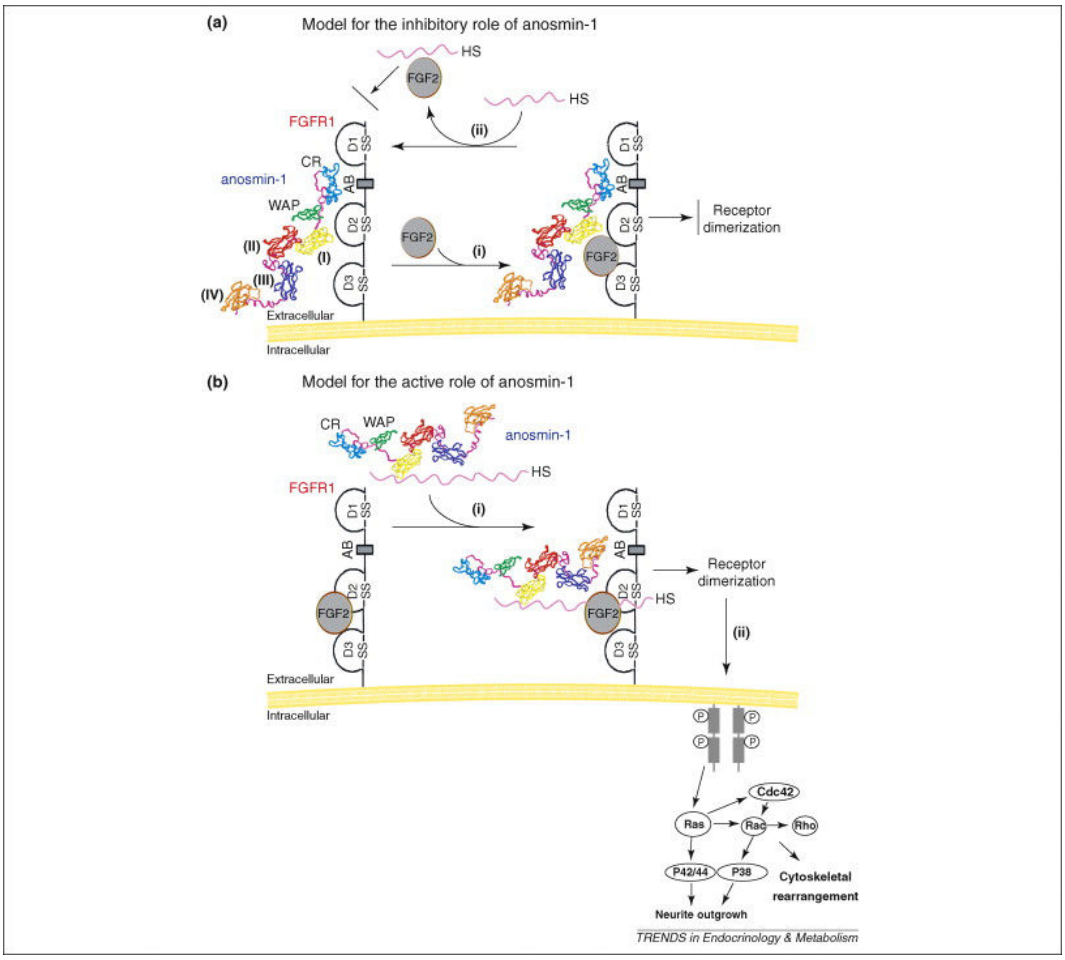


Figure 22 : Modèle théorique alternatif d'interaction entre FGFR1 et son ligand, l'anosmine-1 et l'héparine sulfate (HS).

[a] Rôle inhibiteur de la formation du complexe FGFR1-HS. L'anosmine-1 se fixe à la place de l'HS ou de FGF2.

[b] Rôle facilitateur de la formation du complexe FGFR1-HS. HS lié à l'anosmine-1 a une affinité accrue pour le complexe FGFR1-FGF2 déjà formé.

Hu Y et al., Trends Endocrinol Metab., 2010

intracytoplasmique s'active par autophosphorylation au niveau des tyrosines. Une interaction avec les héparines-sulfates est nécessaire pour la dimérisation et l'activation du complexe récepteur-ligand [117,118]. L'anosmine-1 (*KAL1*) serait un stabilisateur de ce complexe FGFR1-FGFs, expliquant la proximité des phénotypes retrouvés [119] **(*Cf.* Figure 22)**.

FGF8

Le facteur de croissance des fibroblastes 8 (*FGF8* 10q24) est un des principaux ligands de FGFR1 (parmi 11 FGFs capables d'activer FGFR1) dans l'ontogenèse des neurones à GnRH. Falardeau et al. (2008)[120], par analyse d'une grande cohorte de patients ayant un nCHH, ont identifié six mutations faux-sens de ce gène candidat [120]. Comme pour *FGFR1*, les patients présentaient des atteintes de l'axe gonadotrope et de l'olfaction de gravité très variables. La transmission est autosomique dominante, et on retrouve les mêmes atteintes osseuses dentaires et de la ligne médiane que pour le récepteur **(*Cf.* Figure 22)**.

HS6ST1

Le gène *HS6ST1* (2q21) code une enzyme impliquée dans la modification post traductionnelle des héparines-sulfates, composants de la matrice extracellulaire jouant un rôle modulateur important dans la communication intercellulaire qui est essentielle au développement neuronal [121]. Cette modification des héparines-sulfates est notamment impliquée dans l'activation du complexe entre les FGF et leur récepteur FGFR1 en interaction avec l'anosmine-1 [122,123]. Ces données sont essentiellement issues d'expériences sur le nématode [99,124]. Des mutations de *HS6ST1* ont été identifiées à l'état homozygote mais surtout à l'état hétérozygote chez des patients présentant un nCHH ou un syndrome de Kallmann. Ils présentent une grande variabilité de sévérité du phénotype HH, notamment entre membres d'une même famille partageant une même mutation [125]**(*Cf.* Figure 22)**.

PROK2 / PROKR2

Les Prokinéticines sont des protéines sécrétées qui régulent divers processus biologiques, notamment la morphogenèse des bulbes olfactifs et la reproduction.

En 2006, Masumoto et al. [126] ont montré que le récepteur couplé aux protéines G PROKR2 est nécessaire pour le développement des bulbes olfactifs et la reproduction chez le rat[126]. Les souris KO pour Prokr2 et Prok2 présentent un phénotype reproduisant celui du syndrome de Kallmann [127]. Des mutations à l'état hétérozygote de *PROKR2* et de son ligand *PROK2* ont été identifiées initialement par Dode et al. (2006), par l'étude d'une cohorte de 192 patients atteints du syndrome de Kallmann [128]. Puis des mutations de ces gènes ont été identifiées par d'autres équipes chez des patients nCHH et Kallmann. Il existe une grande variabilité phénotypique chez les patients porteurs de mutations allant d'un CHH complet à un HH partiel avec réversibilité possible à l'âge adulte et des modes de transmission supposés aussi bien dominant comme initialement rapportés ou récessifs [128–130]. Cette variabilité phénotypique très importante, la pénétrance incomplète des mutations identifiées dans les familles et leur présence à l'état hétérozygote ou homozygote interrogent l'importance du rôle des mutations *PROK2* et *PROKR2* dans les CHH. Toutefois, la présence de mutations d'autres gènes connus chez des patients CHH et porteurs de mutations hétérozygotes a permis dans quelques cas de démontrer des modes de transmission oligénénique [131,132]. Des associations avec des dysplasies fibreuses, une obésité sévère, des troubles du sommeil, des syncinésies d'imitation et des épilepsies ont également été décrites [128–130].

NELF

Le gène Nasal Embryonic LHRH Factor (*NELF*) a été initialement identifié chez la souris en 2003 comme facteur participant à la migration des neurones à GnRH et olfactifs [133]. Il s'agissait donc d'un gène candidat pour le syndrome de Kallmann. En 2004, Miura et al[134] ont rapporté une mutation grâce à l'analyse d'une cohorte de 65 patients présentant un syndrome de Kallmann. Le rôle de *NELF* dans la reproduction n'est pas encore clairement démontré. Son mode de transmission n'est pas encore clairement déterminé. Des mutations de ce gène sont retrouvées fréquemment avec des mutations d'autres gènes comme *FGFR1* et *HS6ST1*. Il pourrait participer au syndrome de Kallmann dans un mode de transmission oligogénique [114,125,135].

Hypogonadismes Hypogonadotropes Syndromiques

Les hypogonadismes hypogonadotropes sont aussi diagnostiqués au sein de formes syndromiques plus complexes.

Syndrome de Prader Willi

Ce syndrome associe CHH, retard mental, obésité avec troubles du comportement, petite taille et hypotonie. Les anomalies génétiques identifiées sont des délétions interstitielles 15q11, des translocations ou des disomies uniparentale. C'est un syndrome de gènes contigus à empreinte parentale [136–138]

Syndrome de Bardet-Biedl

C'est un syndrome complexe associant CHH, retard mental, polydactylie, obésité et rétinite pigmentaire. Les recherches ont mis en évidence une grande hétérogénéité génétique (29 gènes identifiés à ce jour).[139–141]

Syndrome CHARGE

Des mutations du gène *CHD7* (8q12.2) ont été identifiées dans le syndrome CHARGE caractérisé par l'association variable de plusieurs anomalies, principalement un colobome, une atrésie/sténose choanale, des anomalies des nerfs crâniens et de l'oreille (Coloboma : colobome, Heart defect : malformations cardiaques, Atresia choanae : atrésie des choanes, Retarded growth and development : retard de croissance, Genital hypoplasia : hypoplasie génitale, Ear : anomalies des oreilles). C'est un syndrome de transmission autosomique dominante multisystémique dont certains traits phénotypiques sont chevauchants avec le syndrome de Kallmann et les nCHH [142]. Le séquençage de *CHD7* a permis d'identifier des mutations dans une série de patients ayant un nCHH ou un syndrome de Kallmann avec une prévalence de 6 % [143,144]. Des mutations de ce gène sont particulièrement à rechercher lorsque le tableau clinique d'un patient CHH comprend un défaut d'audition (caractéristique fréquente également pour les mutations de *SOX10* et *ILR17D*) ou une aplasie des canaux semi circulaires.

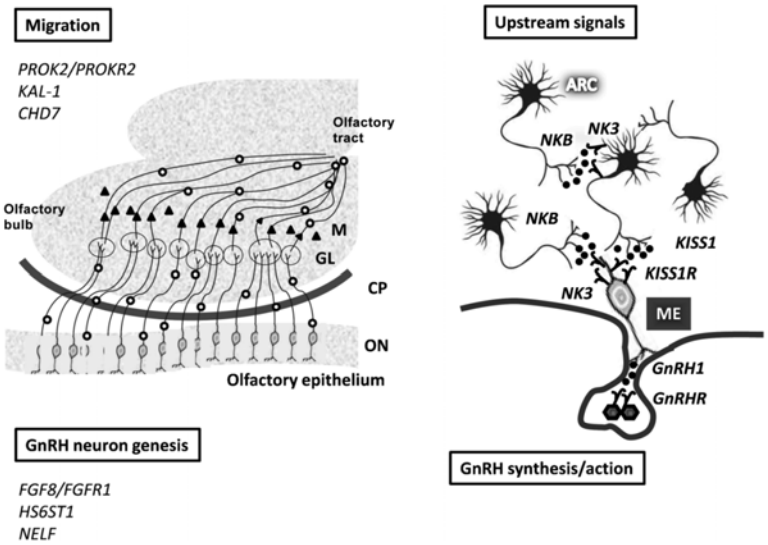


Figure 23 : Schéma illustrant le rôle des gènes dans l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

A gauche, les gènes et les fonctions provoquant le syndrome de Kallmann. A droite, les nCHH.

Abréviations : ARC Noyau arqué, CP Lame criblée, GL Glomérule, M cellules mitrales, ME Eminence médiane, ON Neurones olfactifs.

D'après Bonomi et al., J Asian of Andrology, 2012

Gene	Transmission	Phenotype	Cryptorchidism	Micropenis
Normosmic CHH				
GNRH1	Autosomal recessive	Isolated CHH	+	+
GNRHR	Autosomal recessive	Isolated CHH	+	+
KISS1R	Autosomal recessive	Isolated CHH	+	+
TAC3	Autosomal recessive	Isolated CHH	+	+
TACR3	Autosomal recessive	Isolated CHH	+	+
Kallmann syndrome				
KAL1	X-linked	CHH Anosmia/hyposmia	++	++
FGFR1	Autosomal dominant	CHH Anosmia/hyposmia	+	+
FGF8	Autosomal recessive, digenic or oligogenic	CHH Anosmia/hyposmia	+	+
*PROK2**	Autosomal recessive, digenic or oligogenic	CHH Anosmia/hyposmia	+	+
*PROKR2**	Autosomal recessive, digenic or oligogenic	CHH Anosmia/hyposmia	+	+
WDR11	NR	CHH Anosmia/hyposmia	+	NR
NELF	NR	CHH Anosmia/hyposmia	+	NR
Complex syndromic CHH				
CHD7	Autosomal dominant	CHARGE or Kallmann	+	+
PROP1	Autosomal recessive	Combined pituitary deficiencies or isolated CHH	+	+

Figure 24 : Caractéristiques génétiques et cliniques associées aux mutations des gènes responsables de SK et nCHH.

Abréviations: CHARGE, coloboma, heart defect, choanal atresia, retarded growth and development, genital hypoplasia, ear abnormalities and/or hearing loss defect; CHH, congenital hypogonadotropic hypogonadism; NR, not reported; +, lower penetrance; ++, higher penetrance.

D'après Bouvattier et al., Nat. Rev. Endocrinol.,2011

Autres gènes identifiés chez des patients ayant un CHH

Mode de transmission autosomique dominant :

- *SOX10* (avec surdité) impliqué dans le syndrome Waardenburg-Shah [145]
- *WDR11* (WD repeat protein 11) [146]

Mode de transmission récessif :

- *LEP* (leptin) avec obésité [147]
- *PROP1* Déficit combiné en hormones hypophysaires

Mode de transmission lié à l'X :

- *NR0B1* (*DAX1*) Régulateur du récepteur de l'acide rétinoïque. Impliqué dans l'hypoplasie congénitale des surrénales avec hypogonadisme hypogonadotrope [148]

Mode de transmission non encore déterminé :

- *FGF17* [149], *DUSP6* [149], *SPRY4* [149], *FLRT3* [149], *IL17RD* (avec surdité) [149], *HESX1* (Déficit combiné en hormones hypophysaires et dysplasie septo-optique) [150], *LEPR* (leptin receptor) avec obésité [151], *PCSK1* (proprotein convertase-1) [152]

En résumé les étiologies génétiques des CHH procèdent de deux mécanismes physiopathologiques différents **(*Cf.* Figure 23)**.

Le premier est un mécanisme plutôt direct altérant la sécrétion ou l'action de l'hormone pivot de l'axe gonadotrope : la GnRH. Ces HHC se caractérisent par un déficit gonadotrope isolé mais assez constant. Le second est un mécanisme affectant le développement embryonnaire affectant notamment la localisation des neurones à GnRH mais également d'autres populations cellulaires conduisant à des phénotypes à la fois plus larges et plus inconstants **(*Cf.* Figure 24)**.

Conseil Génétique

Le conseil génétique permet aux patients et à leur famille de comprendre les résultats des examens génétiques et d'appréhender comment ces résultats vont contribuer à la prise en charge médicale, psychologique et familiale de leur pathologie. Il comporte une part d'information médicale sur la pathologie, la plus fiable possible compte tenu de l'état de la science, et sur les risques qu'elle engendre, les moyens de la prendre en charge d'un point de vue psychologique, émotionnel et social (aspects particulièrement importants dans cette maladie touchant à la fonction reproductive et à l'apparence physique, de plus diagnostiquée majoritairement chez des adolescents et de jeunes adultes) ainsi que des conseils lors de prises de décisions médicales et de la vie civile. Il doit de plus permettre d'évaluer un risque de récurrence pour les membres de la famille et orienter le choix des examens complémentaires à effectuer.

Sur le plan pratique et clinique, il nécessite une exploration exhaustive du phénotype du patient sur le plan endocrinien et non endocrinien, un interrogatoire poussé à la recherche de signes cliniques dans la famille sur au moins trois générations, pouvant être reliés à une des formes génétiques des CHH. Ceci afin d'identifier un mode de transmission de la maladie (mais 70 % des cas diagnostiqués sont considérés comme sporadiques) et de réduire le nombre de causes génétiques possibles pour affiner et accélérer les explorations diagnostiques.

Sur le plan de la génétique, ce conseil génétique demande donc des connaissances sur le spectre phénotypique de chaque forme génétique et la pénétrance de leurs mutations, leur mode de transmission et les probabilités d'atteinte des différents gènes selon leur prévalence dans les cas où l'anomalie moléculaire n'est pas identifiée.

La génétique des CHH est malheureusement complexe :

- une grande hétérogénéité génétique et donc des analyses longues par Sanger,
- une grande variabilité phénotypique (atteinte isolée ou syndromiques),

- des atteintes plus ou moins graves en dehors de la reproduction avec des handicaps non réversibles ou curables (Anosmie, surdité, troubles neurologiques…),
- une inconstance des effets des mutations pour de nombreux gènes,
- tous les modes de transmission sont possibles dans le syndrome de Kallmann (liée à l'X, dominant et récessif, *de novo*).

Étant donné la possibilité d'induction de la fertilité et celle de procréation médicalement assistée pour ces patients atteints de CHH, la question nouvelle de risque de la transmission de la maladie à la descendance est désormais fréquemment posée par les patients et est même à évoquer par le spécialiste [153–155].

Pour une suspicion de transmission autosomique dominante, le risque théorique de transmission de l'allèle muté à la descendance est de 50 %. Une exploration hormonale au moment de la mini puberté est alors recommandée. Selon le gène considéré, le phénotype de l'enfant ne sera pas forcément le même que celui du parent transmetteur (exemple de *FGFR1*).

Dans les cas de transmission autosomique récessive, et à l'exclusion d'union avec consanguinité, le risque de transmission de la pathologie est extrêmement faible étant donné la faible fréquence des mutations dans la population générale et le conseil génétique peut être rassurant pour le couple.

Dans le cas de syndrome de Kallmann lié à l'X, le conseil génétique doit informer sur l'absence de risque de transmission de père en fils, le caractère transmettrice obligatoire d'une fille issue d'un père atteint, tandis que la mère transmettrice a un risque de 50 % d'avoir une fille transmettrice ou un fils atteint. Chez les femmes hétérozygotes, le risque de mosaïque d'inactivation de l'X et sa contribution à certains traits phénotypiques n'est pas encore bien élucidé. L'hypothèse alternative serait un mécanisme d'oligogénicité avec l'éventuelle participation de mutations sur d'autres gènes.

Lorsque les patients portent des mutations dans plusieurs gènes différents impliqués dans les CHH, le conseil génétique est difficile et le risque de transmission est difficilement prédictible. La généralisation du séquençage de nouvelle

génération (NGS) va probablement améliorer le diagnostic moléculaire du CHH [156] en écartant le risque d'oligogénicité dans beaucoup de cas, en augmentant le taux d'élucidation génétique dans un délai plus compatible avec les attentes des patients. Mais le NGS va probablement le complexifier à mesure que la recherche identifiera des modulateurs faibles ou des combinaisons de facteurs influençant la fonction reproductive.

PROBLEMATIQUE – OBJECTIFS

Au commencement de ce travail, le caractère héréditaire des hypogonadismes hypogonadotropes congénitaux (CHH) était formellement établi. De nombreuses études, menées depuis les années 1990, avaient permis d'identifier différents gènes. Il s'agissait pour le syndrome de Kallmann de gènes impliqués dans le développement embryonnaire, *i.e. KAL1, FGFR1, PROKR2* et *PROK2* et pour les formes nCHH sans anosmie différents gènes impliqués dans la signalisation gonadotrope, i.e. *GNRHR, GNRH1, KISS1R, TACR3 et TAC3.*

Notre projet repose sur le constat que bien que la recherche de mutations des gènes CHH connus était proposée de façon systématique, il n'était pas possible d'identifier l'étiologie génétique chez plus de 20 % des patients. Il était donc indispensable d'étudier la prévalence et de caractériser les mécanismes physiopathologiques des différents gènes connus. D'autre part il était essentiel de poursuivre les études visant à identifier de nouveaux gènes.

Cette thèse comporte par conséquent deux parties :

Partie I : Prévalence des mutations, caractérisation moléculaire des événements et profils neuroendocriniens de patients porteurs de mutations des gènes de la signalisation hypothalamique gonadotrope.

Dans cette première partie, nous étudions les gènes *KISS1R, TAC3 et TACR3*, impliqués dans la signalisation hypothalamique gonadotrope. L'objectif était de mettre en œuvre un programme de caractérisation fonctionnelle systématique des événements moléculaires identifiés pour ces gènes. Il s'agissait d'établir une prévalence basée sur des événements moléculaires dont le caractère délétère était formellement établi. Ce travail a été utile pour établir des corrélations génotype - phénotype fiables et pour proposer des hypothèses physiopathologiques. En termes de corrélation génotype - phénotype, une attention toute particulière sera portée au profil neuroendocrinien des patients. Ce travail offre des perspectives

importantes pour améliorer la prise en charge des patients et de leur famille dans le cadre du conseil génétique.

Partie II : Identification de nouveaux gènes des CHH syndromiques.

Afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans les CHH, nous avons mis en œuvre différentes approches, « gènes candidats » et « sans *a priori* » (CGH-array, études de liaison génétique et analyses d'exome par séquençage nouvelle génération).

Nous aborderons principalement les différentes approches sans *a priori* qui ont été mises en œuvre pour identifier l'implication de *SEMA3A* (Semaphorine 3A) dans le syndrome de Kallmann et de *PNPLA6* dans le syndrome de Gordon Holmes (GHS).

Nous terminerons par une rapide présentation de l'approche gène candidat par séquençage nouvelle génération qui est actuellement mise en œuvre au laboratoire.

PARTIE I :

PREVALENCE DES MUTATIONS, CARACTERISATION MOLECULAIRE DES EVENEMENTS ET PROFILS NEUROENDOCRINIENS DE PATIENTS PORTEURS DE MUTATIONS DES GENES DE LA SIGNALISATION HYPOTHALAMIQUE GONADOTROPE

nCHH Classique par mutations de *KISS1R*

Article *Brioude et al PLoS One 2013*

OPEN ACCESS Freely available online PLOS | ONE

Two Families with Normosmic Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism and Biallelic Mutations in *KISS1R (KISS1 Receptor)*: Clinical Evaluation and Molecular Characterization of a Novel Mutation

Frédéric Brioude[1,2], Jérôme Bouligand[1,2,3], Bruno Francou[1,2,3], Jérôme Fagart[1,2], Ronan Roussel[4,5], Say Viengchareun[1,2], Laurent Combettes[6], Sylvie Brailly-Tabard[1,2,3], Marc Lombès[1,2,7], Jacques Young[1,2,7], Anne Guiochon-Mantel[1,2,3]

Introduction de l'article *Brioude et al PLoS One 2013*

Caractérisation clinique et fonctionnelle des mutations *KISS1R* identifiées dans deux familles nCHH.

Le gène *GPR54* a été découvert en 2003 par l'équipe de N. de Roux comme étant une cause d'HHC. C'est une approche d'homozygosity mapping (recherche de régions homozygotes sur le génome communes aux cas atteints) dans une grande famille consanguine avec cinq cas de CHH au sein d'une même fratrie qui a permis d'identifier la première mutation de ce gène. Il s'agissait d'une délétion de 155 nucléotides à l'état homozygote et l'absence de signes cliniques chez les hétérozygotes mettait en évidence une transmission autosomique récessive.

La découverte de l'implication de cette voie de signalisation était inattendue. GPR54 est resté longtemps un récepteur à sept domaines transmembranaires orphelin [48]. Ce gène a finalement été rebaptisé *KISS1R* en lien avec ses ligands « Kisspeptines » (Kp) [50,52]. L'activation de ce récepteur est susceptible de diminuer la motilité et la prolifération cellulaire sur le modèle cellulaire de mélanome B16-BL6 [51], ces ligands ont donc été catégorisés comme « suppresseurs de tumeur ». Ce sont les travaux de N. de Roux et al. [53], complétés des travaux de Seminara et al. [54] qui ont formellement impliqué cette voie de signalisation dans la fonction gonadotrope.

Les ligands de KISS1R (Kp54 et Kp10 découvert en 2001) sont codés par le gène *KISS1*. Depuis 2003, les gènes *KISS1R* et *KISS1* ont été séquencés de façon intensive pour préciser l'implication de cette voie de signalisation dans le CHH. Seules 14 mutations de *KISS1R* ont été publiées entre 2003 et 2013 et uniquement une mutation du ligand *KISS1* a été découverte par Topaloglu et al. en 2012 [65].

En 2013, les conséquences biochimiques et neuroendocriniennes des mutations de *KISS1R* sont mal connues. D'autre part, le rôle de cette voie de signalisation en dehors de l'axe hypothalamo-hypophysaire n'est pas non plus documenté bien que l'expression tissulaire du récepteur et du ligand soit connue (placenta, testicules,

amygdale et différents modèles tumoraux). Enfin, la transmission récessive par perte de fonction du récepteur est discutée car certaines équipes rapportent des patients atteints de CHH simplement hétérozygote pour des mutations de *KISS1R.* Ils évoquent une possible transmission oligogénique comme cela a été observé pour des gènes affectant la migration des neurones à GnRH dans les CHH avec anosmie [131].

Dans ce travail, nous rapportons les mutations identifiées chez deux patients atteints de nCHH non apparentés dont une forme familiale. La caractérisation fonctionnelle est réalisée sur les deux voies de signalisation principales connues du récepteur (MAP kinases et Phospholipase C). Nous proposons également le premier modèle tridimensionnel du récepteur par homologie avec le récepteur OPRK1 (kappa opioid receptor) permettant de prédire *in silico* les conséquences sur l'adressage membranaire et la fonction du récepteur de différentes substitutions d'acides aminés. Enfin nous rapportons des tentatives de restauration de la fertilité chez les patients mutés.

Two Families with Normosmic Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism and Biallelic Mutations in *KISS1R (KISS1 Receptor)*: Clinical Evaluation and Molecular Characterization of a Novel Mutation

Frédéric Brioude[1,2,9¤], Jérôme Bouligand[1,2,3,9], Bruno Francou[1,2,3], Jérôme Fagart[1,2], Ronan Roussel[4,5], Say Viengchareun[1,2], Laurent Combettes[6], Sylvie Brailly-Tabard[1,2,3], Marc Lombès[1,2,7], Jacques Young[1,2,7*¶], Anne Guiochon-Mantel[1,2,3*¶]

1 Faculté de Médecine Paris-Sud UMR-S693, Univ Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre, France, **2** INSERM U693, IFR93, Le Kremlin Bicêtre, France, **3** Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Le Kremlin Bicêtre, France, **4** Université Paris–Diderot, Paris 7, Paris, France, **5** Département d'Endocrinologie Diabétologie et Nutrition, Hôpital Bichat, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France, **6** Faculté des Sciences, INSERM UMR-S757, Univ Paris-Sud, Orsay, France, **7** Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction and Centre de Référence des Maladies Endocriniennes Rares de la Croissance, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

Abstract

Context: *KISS1R* mutations have been reported in few patients with normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism (nCHH) (OMIM #146110).

Objective: To describe in detail nCHH patients with biallelic *KISS1R* mutations belonging to 2 unrelated families, and to functionally characterize a novel *KISS1R* mutation.

Results: An original mutant, p.Tyr313His, was found in the homozygous state in 3 affected kindred (2 females and 1 male) from a consanguineous Portuguese family. This mutation, located in the seventh transmembrane domain, affects a highly conserved amino acid, perturbs the conformation of the transmembrane segment, and impairs MAP kinase signaling and intracellular calcium release. In the second family, a French Caucasian male patient with nCHH was found to carry two recurrent mutations in the compound heterozygous state (p.Leu102Pro/Stop399Arg). In this man, pulsatile GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) administration restored pulsatile LH (Luteinizing Hormone) secretion and testicular hormone secretion. Later, long-term combined gonadotropin therapy induced spermatogenesis, enabling 3 successive pregnancies that resulted in 2 miscarriages and the birth of a healthy boy.

Conclusion: We show that a novel loss-of-function mutation (p.Tyr313His) in the *KISS1R* gene can cause familial nCHH, revealing the crucial role of this amino acid in KISS1R function. The observed restoration of gonadotropin secretion by exogenous GnRH administration further supports, in humans, the hypothalamic origin of the gonadotropin deficiency in this genetic form of nCHH.

Citation: Brioude F, Bouligand J, Francou B, Fagart J, Roussel R, et al. (2013) Two Families with Normosmic Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism and Biallelic Mutations in *KISS1R (KISS1 Receptor)*: Clinical Evaluation and Molecular Characterization of a Novel Mutation. PLoS ONE 8(1): e53896. doi:10.1371/journal.pone.0053896

Editor: Andreas R. Janecke, Innsbruck Medical University, Austria

Received August 26, 2012; **Accepted** December 4, 2012; **Published** January 18, 2013

Copyright: © 2013 Brioude et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Paris-Sud University (Bonus Qualité Recherche 2009), INSERM KalGenopath 09-GENO-017, PHRC HYPOPROTEO P081212, Agence Française de lutte contre le Dopage (AFLD)and BMBS intergovernmental framework for European Cooperation in Science and Technology (COST) Action BM1105: GnRH deficiency: Elucidation of the neuroendocrine control of human reproduction. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: anne.mantel@bct.aphp.fr (AGM); jacques.young@bct.aphp.fr (JY)

9 These authors contributed equally to this work.

¶ These authors also contributed equally to this work.

¤ Current address: Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Trousseau, Service d'Explorations Fonctionnelles Endocriniennes, Paris, France

Introduction

Congenital hypogonadotropic hypogonadism (CHH) results from abnormal gonadotropin secretion and is characterized by impaired pubertal development in both genders [1–4]. Identification of genetic abnormalities related to CHH has provided major insights into the pathways critical for the development, maturation and function of the reproductive axis [5,6].

CHH may be caused by defective GnRH release or by a gonadotrope cell dysfunction in the pituitary. Loss-of-function

mutations in the GnRH receptor were the first molecular defects to be found in patients with normosmic CHH (nCHH) [7–10] and are now recognized as one of the most frequent causes of familial autosomal recessive nCHH [11]. These patients are usually resistant to exogenous GnRH, but fertility can often be achieved through gonadotropin administration.

GnRH secretion is defective in most patients with nCHH and many nCHH-associated mutations leading to defective GnRH secretion have been described since ten years. These consist of loss-of-function mutations of *KISS1R/GPR54* [12–20] or its ligand Kiss [21], the *TAC3 (Tachykinin 3)* gene coding for neurokinin B and its receptor NK3R (Neurokinin 3 receptor), encoded by *TACR3 (Tachykinin receptor 3)* [22–26], and loss-of-function mutations of *GNRH1* [27,28].

Only few patients with *KISS1R* mutations (NM_032551.4) have so far been reported [12–20], and the description of new cases is thus needed to define the phenotypic range of this genetic form, as well as the mechanism underlying the gonadotropin deficiency. Characterization of new mutations can also help to unravel the functional anatomy of this receptor.

Here we describe a new family with an original deleterious mutation carried in the homozygous state. We have undertaken to evaluate the functional consequences of this mutation. To this aim, we studied two well known KISS1R activated cascades. The phospholipase C pathway was assessed by measuring intracellular calcium mobilization while the MAP kinase pathway was tested by analyzing both the phosphorylation status of ERK1/2 by means of western blot analysis and the transactivation of serum responsive elements driven reporter luciferase gene. We also provide a detailed description of a male nCHH patient with 2 recurrent mutations carried in the compound heterozygous state but in a previously undescribed genetic combination, and we reinforce the concept that CHH in this genetic form is due to GnRH deficiency.

Case reports

Family 1. The family 1 propositus (subject II-8, Fig. 1A) was a 55-year-old man originating from Portugal who was referred in 2004 to the Endocrinology and Reproductive Diseases Department of Bicêtre Hospital for gynecomastia and hypogonadism. He stated that he had never experienced pubertal development or had sexual intercourse, and that his unaffected parents were first cousins. He had typical hypogonadism, with small intrascrotal testes (2 and 3 mL right and left, respectively), near-normal pubic hair (P4), and a penis length of 4 cm. His height was 173 cm and his weight 76 kg. The karyotype was normal (46, XY). His sense of smell was normal on olfactometry [29]. Pituitary and olfactory bulb magnetic resonance imaging (MRI) and renal sonography were also normal.

At initial evaluation his serum testosterone, FSH (Follicle stimulating Hormone), LH and inhibin B levels were very low, (Table 1). After a single bolus of 100 µg of GnRH intravenously (IV), LH levels rose from a baseline of 0.2 to a peak of 5.1 IU/L, and FSH rose from 0.1 to 4.1 IU/L.

His two affected sisters (subject II-1 and subject II-3, Fig. 1A), who were initially evaluated at the ages of 30 and 32 years, respectively, also had complete hypogonadism and said they had a normal sense of smell. At diagnosis, both sisters had absent breast development but near-normal pubic hair (P4). Menarche had never occurred. Initial hormone assays revealed very low serum estradiol, LH and FSH levels in the two sisters (Table 1), both of whom had a normal karyotype (46, XX). Recent hormonal evaluation of an unaffected sister at 52 years of age showed normal levels for age.

Family 2. The family 2 proband (subject II-1, Fig. 1B) was a French Caucasian man born to non consanguineous eugonadal French parents. He was initially referred to our department at age 19 years for absent pubertal development. Physical examination showed typical signs of hypogonadism, with small intrascrotal testes (2 mL) and a penis length of 3.5 cm. His height was 185 cm and his weight 73 kg. His karyotype was normal (46, XY). He had very low levels of serum testosterone (0.25 ng/mL), serum LH (0.15 IU/L) and FSH (0.2 IU/L), which did not respond to GnRH challenge (Table 1). He was again seen at age 27 years, 3 months after he had decided to stop testosterone enanthate therapy. His mean testicular volume was still low (3 mL), as were his testosterone (T), gonadotropins (T: 0.25 ng/mL, LH: 0.12 IU/L, FSH: 0.17 IU/L), and inhibin B levels (25 pg/mL). At that time, an analysis of basal LH secretion overnight at 10-min intervals for 4 h showed very low levels of this gonadotropin and a nonpulsatile pattern (Fig. 2). On day 16 of pulsatile GnRH administration (100 ng/kg/pulse, every 60 min, sc), pulses of LH release were detected, occurring synchronously with the GnRH boluses (Fig. 2) and concomitantly with an increase in serum testosterone and inhibin B levels.

Androgen therapy (testosterone enanthate, 250 mg every 3 weeks, intramuscular injections) was then resumed, leading to satisfactory libido. One year later his testicular volume was still low (3 mL) and he was azoospermic. As he wished to have children, he was treated for practical reasons with combined gonadotropin therapy (recombinant human FSH, 150 IU three times a week, sc) and hCG (1500 IU three times a week, sc) in order to induce spermatogenesis. This combined therapy led to a gradual but marked increase in testicular volume (10 and 12 mL left and right, respectively) and normalization of testosterone and inhibin B levels. After 22 months of treatment the sperm count was 19×10^6/mL.

His partner became pregnant twice within one year of starting this treatment, but both pregnancies ended in early miscarriage. A healthy boy was born after a third pregnancy.

Pituitary and olfactory bulb magnetic resonance imaging (MRI) were normal in this patient, and olfactometry [29] showed a normal sense of smell.

All the affected patients in family 1 and family 2 had normal renal echography, no craniofacial abnormalities, normal circulating iron, ferritin, IGF1 and prolactin levels, and normal pituitary, adrenal and thyroid function. No other phenotypic abnormalities were found.

Methods

All the participants gave their written informed consent for hormonal exploration and genetic analyses, in keeping with the French Bioethics Law and the Declaration of Helsinki, and after approval by the Bicêtre Hospital ethics committee (Comité de protection des personnes Ile de France, Hôpital Bicêtre).

Hormone assays

We measured serum levels of LH, FSH, inhibin B, testosterone and estradiol by immunoradiometric assay, enzyme-linked immunosorbent assay, or radioimmunoassay, respectively, as previously reported [27,24,30]. The detection limits of the LH and FSH assays were respectively 0.1 IU/L and 0.1 IU/L. The intra- and interassay coefficients of variation were respectively 1.5% and 5.2% for LH, and 2.7% and 5.5% for FSH. Endogenous LH secretion, analyzed with Thomas' algorithm, was measured overnight at 10-minute intervals during 4 hours, as reported elsewhere [7,27].

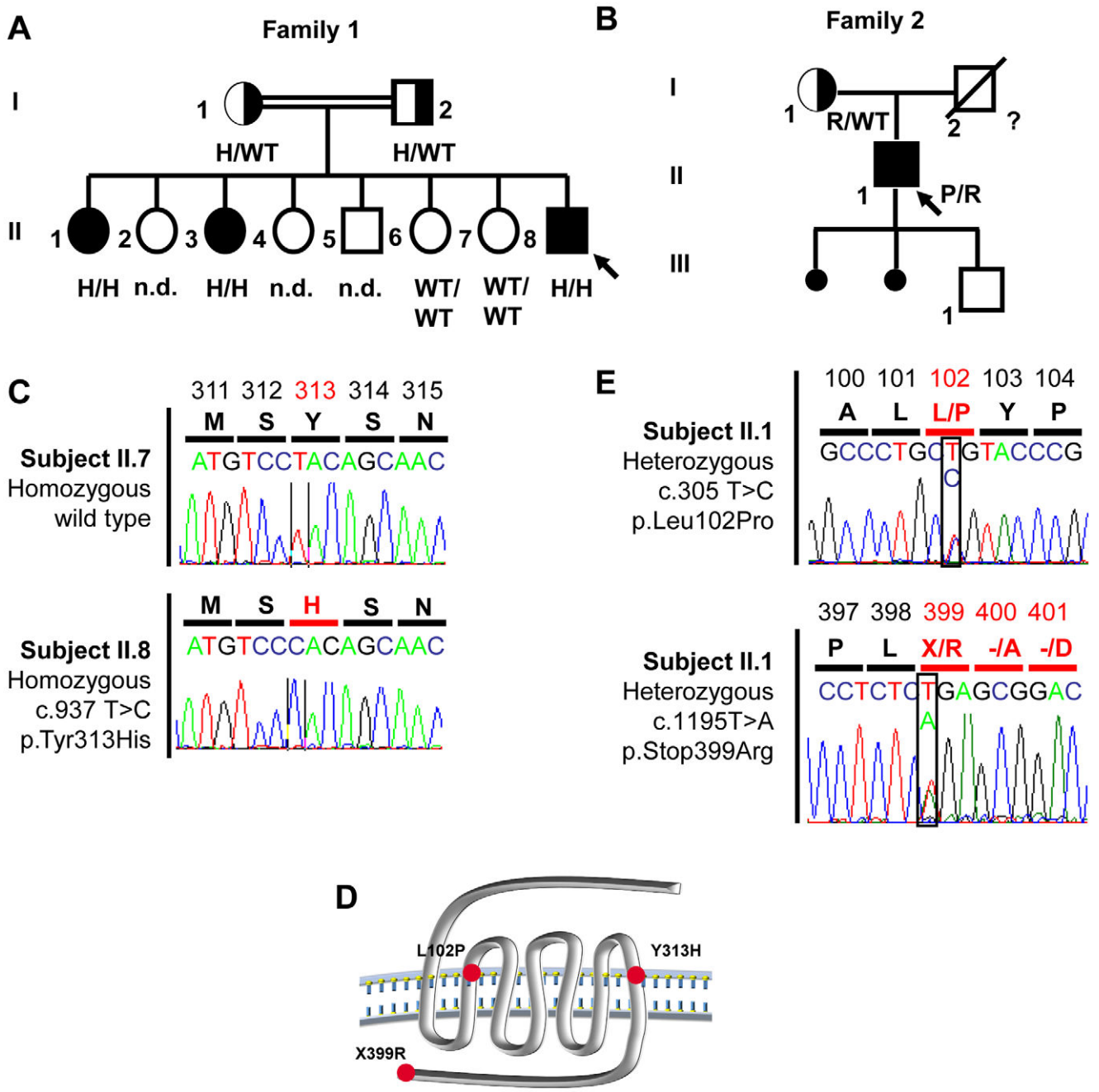


Figure 1. Family pedigrees and corresponding *KISS1R* mutations. Panel A. Pedigree of the family with homozygous *KISS1R* c.937T>C mutation. The proband, subject II-8 (arrow), and his two affected sisters, subjects II-1 and II-3, were homozygous for the c.937T>C mutation. The unaffected mother (I-1) and father (I-2) were heterozygous for the same mutation. Two unaffected sisters, II-6 and II-7, carried two wild-type alleles. This missense mutation (p.Tyr313His, (H)) is located in the seventh transmembrane segment. Squares represent males and circles females. Solid symbols indicate affected subjects and half-shaded symbols unaffected heterozygous. **Panel B.** Pedigree of the family with compound heterozygous *KISS1R* mutations c.305T>C and c.1195T>A. The proband, subject II-1 (arrow), was a compound heterozygote for the *KISS1R* mutations c.305T>C and c.1195T>A. The unaffected mother (I-1) was heterozygous for the c.305T>C mutation. The unaffected father was deceased and therefore unavailable for genetic analysis. The c.305T>C substitution produces a missense mutation (p.Leu102Pro, (P)) in the second transmembrane segment of KISS1R. The c.1195T>A substitution abolishes the natural stop codon (p.Stop399Arg, (R)). Small black circles indicate miscarriages. **Panel C.** Results of automatic DNA *KISS1R* sequencing encompassing the c.937T>C homozygous mutation in the propositus, compared to an unaffected control (lower panel). Inframe amino acids are indicated above each sequence. **Panel D.** Schematic representation of *KISS1R* and location of the mutations. **Panel E.** Results of automatic DNA *KISS1R* sequencing encompassing the c.305T>C and c.1195T>A compound heterozygous mutations in the propositus. Inframe amino acids are indicated above each sequence.

doi:10.1371/journal.pone.0053896.g001

Table 1. Clinical and hormonal characteristics in affected patients with *KISS1R* mutations of two kindred.

Family	**1**				**2**
	nCHH			**normal**	**nCHH**
Subjects (see Fig. 1)	**II-1**	**II-3**	**II-8**	**II-7**	**II-1**
Genotype	c.[937T>C]+c. [937T>C]			[=]+[=]	c.[305T>C]+[1195T>A]
Aminoacid change	p.[Tyr313His]+[Tyr313His]			WT	p. [Stop399Arg]+[Leu102Pro]
Sex/age at diagnosis	F/30	F/32	M/55	F	M/19
Reproductive phenotype at diagnosis	Primary amenorrhea, absent breast development	Primary amenorrhea, absent breast development	Penis: 4 cm Mean TV: 2.5 mL	Hormonal evaluation at menopausal age	Penis: 3.5 cm Mean TV: 2 mL
Reproductive phenotype in heterozygous parents	normal				normal
T (ng/mL)	-	-	0.2	-	0.25
E2 (pg/mL)	15	13	-	10	
FSH (IU/L) Basal/stimulated [(1)]	1.3	1.2	0.1/4.1	45	0.2/1.1
LH (IU/L) Basal/stimulated[(1)]	1.5	0.8	0.2/5.1	27	0.15/1.3
Inhibin B (pg/mL)	-	-	17	-	25
Other anterior pituitary dysfunctions[(2)]	no	no	no	-	no
Anosmia or hyposmia[(3)]	no	no	no	-	no

(1) GnRH, 100 μg IV; (2) Basal Prolactin, FT4 and TSH and GH and cortisol under insulin hypoglycemia challenge test; (3) olfactometry Normal range in adults, LH : 2.8-7.1 IU/L; FSH : 2.4-7.0 IU/L, T : 2.8-9.0 ng/mL, E2 : 24-90 pg/mL (early follicular phase).

doi:10.1371/journal.pone.0053896.t001

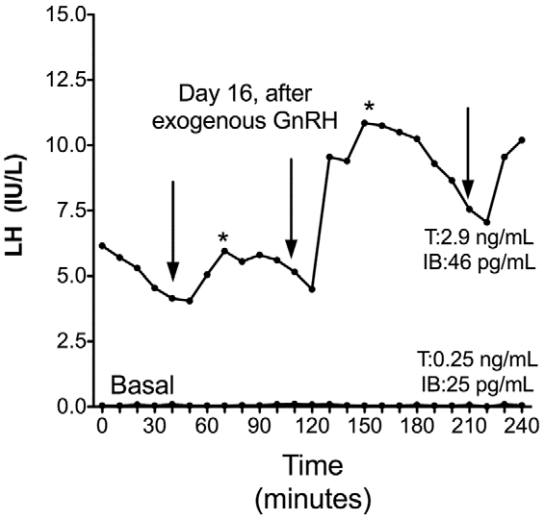


Figure 2. Pattern of LH secretion in a man with complete normosmic CHH due to *KISS1R* mutations (subject II-1, family 2). In this individual with very low and nonpulsatile basal LH levels, LH pulsatility was restored by pulsatile GnRH administration. LH secretion was evaluated for 4 hours before GnRH treatment and also on day 16 of pulsatile GnRH administration. *Arrows* indicate the GnRH boluses and *asterisks* denote detectable pulses, as analyzed with Thomas' algorithm [7,27]. Plasma testosterone (T) levels, which were very low before GnRH treatment, increased after pulsatile GnRH administration in this man, indicating testicular stimulation. Conversion to SI units: testosterone, nanograms per milliliter (x 3.467 = nanomoles per liter). The testosterone normal range in men is 2.8–9.0 ng/ml. IB: low serum inhibin B also increased after pulsatile GnRH administration.
doi:10.1371/journal.pone.0053896.g002

DNA analysis

Genomic DNA was extracted from white blood cells by using standard procedures.

KISS1R coding exons 1, 2, 3, 4 and 5 and intron-exon junctions were amplified by PCR (Polymerase chain reaction) and sequenced as previously described, with minor modifications [12]. Sequence variations were found on both strands and confirmed in a separate PCR analysis.

GNRHR (Gonadotropin Releasing Hormone Receptor), *GNRH1*, *TAC3*, *TACR3*, *KISS1*, *FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1)* and *PROK2/PROKR2 (Prokineticin 2/Prokineticin receptor 2)* were also analyzed as previously described, with minor modifications [7,31,32,27,33,24,21].

Modeling studies

A three-dimensional model of KISS1R was generated by homology with the Modeller package (version 9.10) [34], using as template the crystal structure of the kappa opioid receptor (OPRK1), a hepta-transmembrane protein [35]. *KISS1R* mutants were generated by using the O package [36]. Statistics, calculated with Molprobity [37], showed that 99.0% of the residues in the Ramachandran analysis plot were in the most favored or allowed regions, and that side-chain stereo parameters were within the range of or better than the statistics derived from a set of crystal structures of at least 2.0 Å resolution (see supplemental data Fig. S1). In addition, the PROSAII program gave a combined Z-score (Cβ and surface potentials) of −3.34, a value within the range of structured proteins. These results suggested that the protein was of good quality and suitable for analysis.

Functional studies

Directed mutagenesis. The KISS1R p.Tyr313His mutant was reproduced by site-directed mutagenesis using the pcDNA3.1+ plasmid encoding human KISS1R (*Missouri S&T cDNA Resource Center*) and the QuickChange Stratagen II kit (*Stratagen*, La Jolla, CA). Clones were verified by sequencing.

Intracellular calcium analysis. A fluorometric calcium mobilization assay was used to assess the response of the KISS1R mutant to the kisspeptin-10 (Kp-10) decapeptide (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), a potent KISS1R agonist [15]. This assay was capable of detecting KISS1R activity: calcium flux above baseline for wild-type KISS1R was detected at nanomolar ligand concentrations, with maximal flux achieved at 10^{-7} M.

For intracellular calcium analysis, 15×10^4 COS-7 cells were plated on standard 25-millimeter-diameter coverslips in standard 6-well plates 24 hours before transfection with 500 ng of empty (PCDNA3.1 with no inserted sequence), wild-type or mutant KISS1R-plasmid per well, in the presence of 1.25 µl of Lipofectamine^{TM} 2000 (Lifetechnologies, Saint Aubin, France) in a final volume of 2 ml of Opti-MEM medium (Lifetechnologies). Six hours after transfection the medium was removed and the cells were grown in standard medium. Forty-eight hours after transfection the cells were washed once in PBS and then incubated in modified Hank's buffer saline solution (HBSS) containing Fura-2 AM at a final concentration of 3 µM, for 20 minutes at room temperature. The buffer was then removed and the cells were incubated in HBSS without Fura-2 for 5 minutes. Calcium imaging was then performed with an inverted fluorescence microscope, as previously described [38]. Fluorescence images were collected with a CCD camera (Princeton, USA), digitized and integrated in real time by an image processor (Metafluor, Princeton, USA). A field with 20 to 30 cells was chosen for treatment with kisspeptin 10 (Kp-10) 10^{-9} or 10^{-7} M. Excitation wavelengths were 340 nm (free Fura-2) and 380 nm (bound Fura-2). Emission was read at 510 nm. The 340/380 nm ratio was recorded for 10 minutes. For each cell within the field, we determined the area under the curve (AUC) after stimulation with Kp-10, using GraphPad Prism 5 software.

Western blot analysis. For western blot analysis (3 independent experiments), 15×10^4 HEK-293 cells were plated in standard 6-well plates 72 hours before transfection with 1 µg of wild-type or mutated vector per well, in the presence of 2.5 µl of Lipofectamine^{TM} 2000 (*Invitrogen*) in a final volume of 2 ml of Opti-MEM medium (*Invitrogen*). Six hours after transfection the medium was removed and the cells were grown in standard medium. Forty-eight hours after transfection the cells were treated with Kp-10 (*Sigma-Aldrich*) 10^{-8} M or 10^{-6} M for 5, 10, 20, 30 and 60 minutes. Cells were harvested and lysed, and 30 µg of total protein was deposited on a 12% polyacrylamide gel, separated by electrophoresis, and transferred to a PVDF membrane. The membrane was incubated in blocking solution containing a primary antibody (anti-phospho-p44/p42 MAP kinase; Cell Signaling, USA) at a final concentration of 1/1000 for one hour at room temperature, then in blocking solution containing a secondary antibody (anti-rabbit coupled to peroxidase, 1/15 000; Vector Labs) for one hour at room temperature. The signal was revealed by using ECL-Plus (*GE Healthcare Vélizy, France*) on autoradiographic film. Normalization was based on the use of an anti-p44/42 MAP kinase antibody (*Cell Signaling*, Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France) at a final concentration of 1/1000, following the same steps. The signal was quantified with Quantity One software (*Biorad Marnes La Coquette, France*). Each value of this ratio was expressed as a percentage of the T0 value (untreated cells). Molecular weight was determined with Precision plus

Protein Standards Dual color (Promega). Apparent molecular weight of ERK1/2 (p-42/p-44 kDa) was between the 37 and 50 kDa standards as expected.

Luciferase reporter gene assay. Kisspeptin protein-coupled receptors signal through several second-messenger pathways, including the phosphoinositide and MAP kinase pathways (ERK 1/2) [39–41]. We thus used the luc2P/SRE/Hygro plasmid (*Promega*, Charbonnières Les Bains, France), which can induce luciferase production in response to MAP kinase activation, as a reporter gene system [42]. For SRE activation analysis, 10^5 HEK-293 cells were plated in standard 24-well plates 48 hours before transfection with 50 ng of empty vector PCDNA3.1, wild-type or mutated KISS1R-plasmid, 100 ng of SRE-Luciferase-plasmid and 100 ng of ß-galactosidase-plasmid (for normalization) in the presence of 0.5 µl of Lipofectamine™ per well, in a final volume of 500 µl of Opti-MEM medium. Six hours after transfection the medium was removed and the cells were grown in standard medium. The following day, cells were then incubated with increasing concentrations (from 10^{-10} to 10^{-6} M) of Kp-10 for 6 h before harvesting for ß-galactosidase and luciferase assay, as previously described [26]. Luciferase activity was measured with a luminometer (*Victor*, *Perkin Elmer*, Courtaboeuf, France). Curves were fitted with data from at least three independent experiments performed in triplicate.

Statistical Analysis. Intracellular calcium values are expressed as means +/− SEM. The AUCs for each condition (WT or p.Tyr313His KISS1R transfected cells) were compared by using the Kruskall Wallis test with Dunn's post test to compare each pair of conditions. GraphPad Prism 5 software was used for all statistical analyses. Differences were considered significant at $p<0.05$.

Results

Molecular analyses

The *GNRH1*, *GNRHR*, *KISS1*, *TAC3*, *TACR3*, *FGFR1*, *PROK2* and *PROKR2* exons and intron–exon boundaries were identical to the reference sequences in all the affected members of both 2 families.

The family 1 propositus and 2 affected sisters were found to carry a **homozygous *KISS1R* mutation (c. 937T>C)** (subjects II-1, II-3 and II-8, Fig. 1A and Fig. 1C). The mutation was found in the heterozygous state in the patient's unaffected mother (subject I-1, Fig. 1A) and father (subject I-2, Fig. 1A). This substitution results in a missense mutation (p.Tyr313His) affecting a highly conserved amino acid (Fig. 3A) located in the seventh transmembrane segment (Fig. 1D). This mutation was not found by genomic sequencing in 200 chromosomes from Caucasian eugonadal subjects.

In the family 2 propositus II.1 (Fig. 1B) we found a **compound heterozygous *KISS1R* mutation (c.305T>C and c.1195T>A)**. C.305T>C is a recurrent missense mutation (p.Leu102Pro) in the second transmembrane segment of KISS1R (Fig. 1D and Fig. 1E). It has previously been reported in the homozygous state in Arab-Muslim CHH patients, and was characterized as a loss-of-function mutation by Tenembaum et al. [17]. The same mutation was found in the heterozygous state in the unaffected mother.

The c.1195T>A substitution, abolishes the stop codon (p.Stop399Arg) (Fig. 1D). This mutation has previously been reported in the compound heterozygous state in an AfroAmerican man with nCHH, in association with the nonsense p.Arg331stop mutation described by Seminara et al. [13] and characterized as deleterious.

Neither of these mutations was found by genomic sequencing in 200 chromosomes from Caucasian eugonadal subjects.

Modeling and functional studies of the missense mutations

Using the Pipealign program, we found that the kappa opioid receptor OPRK1, for which the crystal structure is available (protein database identity number 4DJH), displayed the strongest homology with KISS1R in the hepta-transmembrane protein family (34% sequence identity). Moreover, OPRK1 is a G-coupled receptor whose natural ligand is dynorphin A or B, peptides with lengths of 13 and 17 amino acids, similar to those of kisspeptin (10, 13 or 14 amino acids). This receptor is thus a good candidate structural template for constructing a KISS1R homology model. This model revealed that Tyr313, which is highly conserved among species, is located in the seventh transmembrane segment (Fig. 1D, Fig. 3A and Fig. 3B) and is in a suitable position to form two hydrogen bonds with Cys95 and Thr99, both of which are located in the second transmembrane segment (Fig. 3B and supplemental data Fig. S2). These peculiar interactions suggest that Tyr313 might stabilize the cohesion of the transmembrane bundle. Moreover, Tyr313 is located at the bottom of the putative binding pocket for kisspeptin and could therefore participate in its anchoring. The shorter side-chain of histidine in the p.Tyr313His mutant receptor, being no longer able to form a hydrogen bond with Cys95 and Thr99, might undermine the cohesion of the transmembrane bundle.

Intracellular calcium flux variations. Fig. 3C shows individual fluorescence variations (AUC values) after Kp-10 administration to cells transfected by empty vector, WT KISS1R or the Tyr313His mutant. Each point of the graph represents one cell in the explored field. The mean AUC was significantly lower in Tyr313His-KISS1R transfected cells than in WT cells after stimulation with Kp-10 at both 10^{-7} M and 10^{-9} M ($p<0.0001$). No difference in AUC was observed between control (empty vector) and Tyr313His-KISS1R.

MAPK pathway activation. WT-KISS1R transfected cells showed an increase in ERK1/2 phosphorylation 5 minutes after treatment with 10^{-8} M Kp-10 (Fig. 3D higher panel). No activation of ERK1/2 phosphorylation was observed in Y313H-KISS1R transfected cells, at either 10^{-8} M (Fig. 3D, lower panel) or 10^{-6} M Kp-10 (data not shown).

To quantify and compare the stimulatory effect of Kp-10 on wild-type and mutant KISS1R, we constructed dose-response curves for HEK-293 cells in the SRE luciferase assay (Fig. 3E). The wild-type KISS1R plasmid led to strong stimulation of the SRE-luciferase plasmid, with an average EC50 of 9.3×10^{-9} M. In contrast, the Tyr313His-KISS1R plasmid failed to stimulate the reporter plasmid (Fig. 3E).

Thus, our functional analyses clearly showed that the Tyr313-His-KISS1R mutant failed to stimulate the p44/42 MAP kinase pathway, contrary to the wild-type receptor, which caused a clear dose-response in the presence of Kp-10.

Discussion

The first aim of this study was to describe the clinical and hormonal features of a new consanguineous family with nCHH and a biallelic *KISS1R* mutation, and to functionally characterize this new mutation. In this family, only subjects with mutations in both alleles had a nCHH phenotype, in keeping with the mainly autosomal recessive transmission in families with this genetic form of nCHH [12–20]. Interestingly, the proband of this family still had a complete gonadotropin deficiency at age 55, indicating that

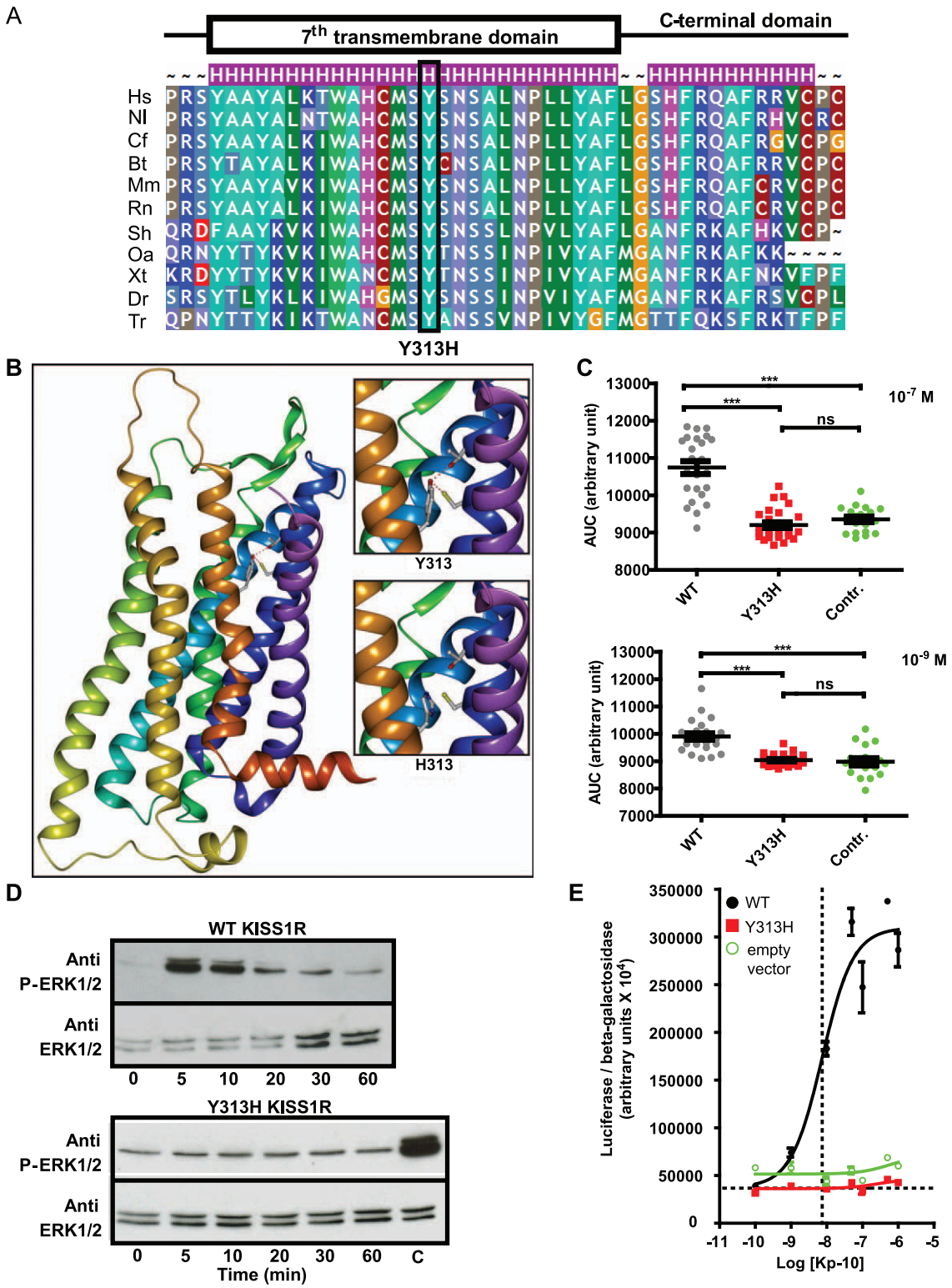


Figure 3. Modeling and functional consequences of the p.Tyr313His *KISS1R* mutation. Panel A. Evolutionary conservation of Tyr313. Tyr313 is totally conserved among KISS1R homologs. Hs: Homo sapiens; Nl: Nomascus leucogenys; Cf: Canis familiaris; Bt: Bos taurus; Mm: Mus musculus; Rn: Rattus norvegicus; Sh: Sarcophilus harrisii; Oa: Ornithorhynchus anatinus; Xt: Xenopus tropicalis; Dr: Danio rerio; Tr: Takifugu rubripes. The substitution is indicated below. **Panel B.** Modeling of the transmembrane region of KISS1R. Tyrosine 313 (and its substitution by a histidine) are located at the bottom of the putative binding pocket for kisspeptin. Tyr313 is in a suitable position to form two hydrogen bonds with Cys95 and Thr99 (see upper insert), both located in the second transmembrane segment. The His substitution abolishes these interactions (lower insert). **Panel C.** Variation of intracytoplasmic calcium concentrations in WT, Tyr313His (Y313H) mutated KISS1R and empty vector. Transfected cells were stimulated by kisspeptin (10^{-7} M and 10^{-9} M): we observe a very significant decrease in calcium release in mutant-KISS1R transfected cells (***$p<0.0001$). Each point represents the area under the curve (AUC) for an individual cell. WT: black circles, Y313H: red squares, empty vector green

circles. **Panel D.** ERK1/2 phosphorylation in WT and Y313H HEK-293 transfected cells. The upper panel shows the marked increase in ERK1/2 phosphorylation in cells transfected with the wild-type KISS1R, after 5 minutes of Kp-10 stimulation. The lower panel shows the absence in ERK1/2 phosphorylation when cells were transfected with the vector containing Y313H-mutated KISS1R. C: positive control: WT KISS1R stimulated by kisspeptin after 5 minutes. Representative figure of 3 independent experiments. **Panel E.** Kp-10 dose-response of the luc2P/SRE reporter. Increasing concentrations of Kp-10 led to a gradual increase in the luciferase activity of wild-type KISS1R (black circles). In contrast, the mutant KISS1R (red squares), like the empty vector (green circles), did not enhance luciferase activity.
doi:10.1371/journal.pone.0053896.g003

CHH in this family is irreversible, as appears to be case of many patients with this genetic form [43].

Investigation of the second family also showed autosomal recessive transmission and demonstrated that the gonadotropin deficiency could be corrected by pulsatile GnRH administration, lending further weight to the concept originally proposed by Seminara et al [13,16], namely that the gonadotropin deficiency in these patients is secondary to their GnRH deficiency as been demonstrated in several animal models [44]. These data therefore further support the idea that loss of KISS1R function in pituitary gonadotropic cells does not have clinically significant consequences in humans in agreement with the absence of KISS1R expression in gonadotrope cells reported in monkeys [45]. Similarly, restoration of spermatogenesis and fertility after gonadotropin therapy in this patient shows that KISS1R loss of function has no direct effect on testicular function.

Another feature of note is that the partner of the family 2 proband had two miscarriages before giving birth to a healthy boy. Indeed, miscarriages have also been reported by Pallais et al. in this setting [16], suggesting that the KISS1R mutation may affect placentation.

The integrity of other ante-pituitary functions in the patients investigated here also shows that loss of KISS1R only affect gonadotrope axis. Of particular interest, corticotrope axis was not affected despite immunoexpression of KISS1R in pituitary cortocotropes cells as reported in non human primates [45].

Investigations of the gonadotropic axis, performed relatively late in the disease course, suggested that nCHH is not reversible in these patients.

The propositus and affected sisters of family 1 carried a new missense mutation, p.Tyr313His, in the homozygous state. Molecular modeling suggested that this mutation, affecting a conserved amino acid in the seventh transmembrane domain, alters the conformation of this domain. The deleterious nature of this variant was confirmed by functional analyses showing impaired intracellular calcium release and defective MAP kinase-mediated KISS1R signaling.

We used the kappa opioid receptor as the reference structure for our modeling study [35], because its sequence is closer to that of KISS1R compared to rhodopsin, the usual reference structure for seven-transmembrane receptors [19].

The lack of stabilizing contacts between the second and seventh transmembrane segments in the Tyr313His mutant receptor, through hydrogen bonds between Cys95, Thr99 and His313, is likely responsible for the loss of capacity to transduce the ligand binding signal and/or the ability to adopt the receptor conformation required for high kisspeptin affinity and binding. Alternatively, the Tyr313His mutation could lead to KISS1R misfolding or dysfunction as previously reported for the p.Phe272Ser KISS1R mutation [19].

In the second family, of Caucasian origin, we found the recurrent mutation p.Leu102Pro, previously described in the homozygous state [17], but present here in the compound heterozygous state. It was associated, in a previously undescribed configuration, with another recurrent mutation, p.Stop399Arg. The latter was first described by Seminara, also in the compound heterozygous state with mutation p.Arg331Stop [13]. Its deleterious nature has been demonstrated in terms of IP3 release [13].

In conclusion, we describe two new families with nCHH and *KISSIR* mutations. One mutation is original and reveals the crucial role of tyrosine 313 located in transmembrane domain 7. In the other family, recurrent mutations described in other ethnic groups were associated in an original format. The observed pituitary and gonadal response to pulsatile GnRH administration supports, in humans, the hypothesis that disruption of the gonadotropic axis due to KISS1R loss of function occurs exclusively in the hypothalamus.

Supporting Information

Figure S1 Rammachandran plots for human KISS1R tridimensional model. Statistics, calculated with Procheck, showed that 99.0% of the residues in the Ramachandran plot were in the most favored or allowed regions, and that side-chain stereo parameters were within the range of or better than the statistics derived from a set of crystal structures of at least 2.0 Å resolution.
(PPT)

Figure S2 Human KISS1R tridimensional model. Panel A: Tyr313, located in the middle of 7th transmembrane segment, is pointing at the hydrophobic core. The hydroxyl group of the tyrosine residue may form 2 hydrogen bonds with Cys95 and Thr99 both located in the 2nd transmembrane segment and stabilize cohesion of transmembrane bundle. These residues may participate in the docking of kisspeptin. Panel B: Focus on the mutated amino-acid residue: on the left, hydroxyl group of Tyr313 residue probably make hydrogenic bond with Cys95 (2.75 Å) and Thr99 (2.62 Å) *(Normal Hydrogenic bond range is 2.7 to 3.2 Å)*. On the right: Imidazole group of histidine mutant residue in position 313 is not able to form hydrogen bond with Cys 95 and Threonine 99 both located in the 2nd transmembrane segment and therefore impair cohesion of transmembrane bundle.
(PPT)

Acknowledgments

We thank Carinne Cogliatti for her excellent technical assistance and Meriem Messina for plasmid preparation. We also thank the Caen University Molecular Genetics Department for providing routine sequencing facilities.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FB JB BF JY AGM. Performed the experiments: FB JB BF SV LC. Analyzed the data: FB JB BF JF LC ML JY AGM. Contributed reagents/materials/analysis tools: RR SBT ML. Wrote the paper: FB JB BF JY AGM.

References

1. Bry-Gauillard H, Trabado S, Bouligand J, Sarfati J, Francou B, et al. (2010) Congenital hypogonadotropic hypogonadism in females: clinical spectrum, evaluation and genetics. Ann Endocrinol (Paris) 71: 158–162.
2. Brioude F, Bouligand J, Trabado S, Francou B, Salenave S, et al. (2010) Non-syndromic congenital hypogonadotropic hypogonadism: clinical presentation and genotype-phenotype relationships. Eur J Endocrinol 162: 835–851.
3. Shaw ND, Seminara SB, Welt CK, Au MG, Plummer L, et al. (2011) Expanding the phenotype and genotype of female GnRH deficiency. J Clin Endocrinol Metab 96: E566–576.
4. Young J (2012) Approach to the male patient with congenital hypogonadotropic hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab 97: 707–718.
5. Mitchell AL, Dwyer A, Pitteloud N, Quinton R (2011) Genetic basis and variable phenotypic expression of Kallmann syndrome: towards a unifying theory. Trends Endocrinol Metab 22: 249–258.
6. Noel SD, Kaiser UB (2011) G protein-coupled receptors involved in GnRH regulation: molecular insights from human disease. Mol Cell Endocrinol 346: 91–101.
7. de Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, Chanson P, et al. (1997) A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. N Engl J Med 337: 1597–1602.
8. Layman LC, Cohen DP, Jin M, Xie J, Li Z, et al. (1998) Mutations in gonadotropin-releasing hormone receptor gene cause hypogonadotropic hypogonadism. Nat Genet 18: 14–15.
9. de Roux N, Young J, Brailly-Tabard S, Misrahi M, Milgrom E, et al. (1999) The same molecular defects of the gonadotropin-releasing hormone receptor determine a variable degree of hypogonadism in affected kindred. J Clin Endocrinol Metab 84: 567–572.
10. Tello JA, Newton CL, Bouligand J, Guiochon-Mantel A, Millar RP, et al. (2012) Congenital hypogonadotropic hypogonadism due to GnRH receptor mutations in three brothers reveal sites affecting conformation and coupling. PLoS One 7: e38456.
11. Chevrier L, Guimiot F, de Roux N (2011) GnRH receptor mutations in isolated gonadotropic deficiency. Mol Cell Endocrinol 346: 21–28.
12. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, et al. (2003) Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 10972–10976.
13. Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., et al. (2003) The GPR54 gene as a regulator of puberty. N Engl J Med 349: 1614–1627.
14. Lanfranco F, Gromoll J, von Eckardstein S, Herding EM, Nieschlag E, et al. (2005) Role of sequence variations of the GnRH receptor and G protein-coupled receptor 54 gene in male idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. Eur J Endocrinol 153: 845–852.
15. Semple RK, Achermann JC, Ellery J, Farooqi IS, Karet FE, et al. (2005) Two novel missense mutations in g protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab 90: 1849–1855.
16. Pallais JC, Bo-Abbas Y, Pitteloud N, Crowley WF, Jr., Seminara SB (2006) Neuroendocrine, gonadal, placental, and obstetric phenotypes in patients with IHH and mutations in the G-protein coupled receptor, GPR54. Mol Cell Endocrinol 254–255: 70–77.
17. Tenenbaum-Rakover Y, Commenges-Ducos M, Iovane A, Aumas C, Admoni O, et al. (2007) Neuroendocrine phenotype analysis in five patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism due to a L102P inactivating mutation of GPR54. J Clin Endocrinol Metab 92: 1137–1144.
18. Teles MG, Trarbach EB, Noel SD, Guerra-Junior G, Jorge A, et al. (2010) A novel homozygous splice acceptor site mutation of KISS1R in two siblings with normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism. Eur J Endocrinol 163: 29–34.
19. Nimri R, Lebenthal Y, Lazar L, Chevrier L, Phillip M, et al. (2011) A novel loss-of-function mutation in GPR54/KISS1R leads to hypogonadotropic hypogonadism in a highly consanguineous family. J Clin Endocrinol Metab 96: E536–545.
20. Breuer O, Abdulhadi-Atwan M, Zeligson S, Fridman H, Renbaum P, et al. (2012) A novel severe N-terminal splice site KISS1R gene mutation causes hypogonadotropic hypogonadism but enables a normal development of neonatal external genitalia. Eur J Endocrinol 167: 209–216.
21. Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz MB, et al. (2012) Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. N Engl J Med 366: 629–635.
22. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, et al. (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.
23. Guran T, Tolhurst G, Bereket A, Rocha N, Porter K, et al. (2009) Hypogonadotropic hypogonadism due to a novel missense mutation in the first extracellular loop of the neurokinin B receptor. J Clin Endocrinol Metab 94: 3633–3639.
24. Young J, Bouligand J, Francou B, Raffin-Sanson ML, Gaillez S, et al. (2010) TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. J Clin Endocrinol Metab 95: 2287–2295.
25. Gianetti E, Tusset C, Noel SD, Au MG, Dwyer AA, et al. (2010) TAC3/TACR3 Mutations Reveal Preferential Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone Release by Neurokinin B in Neonatal Life Followed by Reversal in Adulthood. J Clin Endocrinol Metab 95: 2857–2867.
26. Francou B, Bouligand J, Voican A, Amazit L, Trabado S, et al. (2011) Normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism due to TAC3/TACR3 mutations: characterization of neuroendocrine phenotypes and novel mutations. PLoS One 6: e25614.
27. Bouligand J, Ghervan C, Tello JA, Brailly-Tabard S, Salenave S, et al. (2009) Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. N Engl J Med 360: 2742–2748.
28. Chan YM, de Guillebon A, Lang-Muritano M, Plummer L, Cerrato F, et al. (2009) GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 11703–11708.
29. Eloit C, Trotier D (1994) A new clinical olfactory test to quantify olfactory deficiencies. Rhinology 32: 57–61.
30. Trabado S, Maione L, Salenave S, Baron S, Galland F, et al. (2011) Estradiol levels in men with congenital hypogonadotropic hypogonadism and the effects of different modalities of hormonal treatment. Fertil Steril 95: 2324–2329, 2329 e2321–2323.
31. Dode C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Du N, et al. (2003) Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. Nat Genet 33: 463–465.
32. Dode C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, et al. (2006) Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. PLoS Genet 2: e175.
33. Sarfati J, Guiochon-Mantel A, Rondard P, Arnulf I, Garcia-Pinero A, et al. (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: 659–669.
34. Eswar N, Eramian D, Webb B, Shen MY, Sali A (2008) Protein structure modeling with MODELLER. Methods Mol Biol 426: 145–159.
35. Simonin F, Gaveriaux-Ruff C, Befort K, Matthes H, Lannes B, et al. (1995) kappa-Opioid receptor in humans: cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology, and expression pattern in the central nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 7006–7010.
36. Jones TA, Zou JY, Cowan SW, Kjeldgaard M (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. Acta Crystallogr A 47 (Pt 2): 110–119.
37. Lovell SC, Davis IW, Arendall III WB, de Bakker PIW, Word JM, et al. (2002) Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. Proteins: Structure, Function & Genetics. pp. 437–450.
38. Clair C, Chalumeau C, Tordjmann T, Poggioli J, Erneux C, et al. (2001) Investigation of the roles of Ca(2+) and InsP(3) diffusion in the coordination of Ca(2+) signals between connected hepatocytes. J Cell Sci 114: 1999–2007.
39. Schmidlin F, Roosterman D, Bunnett NW (2003) The third intracellular loop and carboxyl tail of neurokinin 1 and 3 receptors determine interactions with beta-arrestins. Am J Physiol Cell Physiol 285: C945–958.
40. Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, et al. (2008) A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. N Engl J Med 358: 709–715.
41. Szereszewski JM, Pampillo M, Ahow MR, Offermanns S, Bhattacharya M, et al. (2010) GPR54 regulates ERK1/2 activity and hypothalamic gene expression in a Galpha(q/11) and beta-arrestin-dependent manner. PLoS One 5: e12964.
42. Goze C, Berge G, M'Kadmi C, Floquet N, Gagne D, et al. (2010) Involvement of tryptophan W276 and of two surrounding amino acid residues in the high constitutive activity of the ghrelin receptor GHS-R1a. Eur J Pharmacol 643: 153–161.
43. Wahab F, Quinton R, Seminara SB (2011) The kisspeptin signaling pathway and its role in human isolated GnRH deficiency. Mol Cell Endocrinol 346: 29–36.
44. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M (2012) Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. Physiol Rev 92: 1235–1316.
45. Ramaswamy S, Gibbs RB, Plant TM (2009) Studies of the localisation of kisspeptin within the pituitary of the rhesus monkey (Macaca mulatta) and the effect of kisspeptin on the release of non-gonadotropic pituitary hormones. J Neuroendocrinol 21: 795–804.

Conclusion de l'article *Brioude et al. PLoS One 2013*

Caractérisation clinique et fonctionnelle des mutations *KISS1R* identifiées dans deux familles nCHH.

Dans ce travail, nous rapportons chez de nouveaux patients atteints de nCHH une mutation originale et deux mutations déjà décrites par d'autres équipes et donc récurrentes dans la pathologie.

La caractérisation fonctionnelle démontre une perte de signalisation sur les deux voies de signalisation principales connues du récepteur (MAP kinases et Phospholipase C). La perte des effets transcriptionnels de cette voie de signalisation est démontrée pour la première fois.

Le modèle tridimensionnel du récepteur a l'intérêt de permettre de formuler des hypothèses de prédiction de pathogénicité ici validées par les tests fonctionnels.

Enfin nous rapportons la réussite de la restauration de la fertilité par traitement de FSH recombinante et gonadotrophine humaine. L'induction de la spermatogénèse a permis au bout d'un an de traitement trois grossesses, dont la dernière menée à terme d'un garçon en parfaite santé.

Les enquêtes génétiques menées renforcent l'hypothèse de la transmission récessive du phénotype CHH par mutations pertes de fonction du récepteur *KISS1R* et l'existence de mutations récurrentes.

La réussite de l'induction de la fertilité démontre que le rôle de cette voie de signalisation est bien hypothalamique et contrôle la pulsatilité de la GnRH chez l'homme dans l'axe hypothalamo-hypophysaire (HH). En revanche le rôle de cette voie de signalisation en dehors de l'axe HH ne semble pas majeur (spermatogénèse), même s'il existe un doute pour la placentation en raison des deux fausses couches initiales.

nCHH Classique par mutations de *KISS1R*

Article *Francou et al. Hum Reprod. 2016*

human reproduction ORIGINAL ARTICLE *Reproductive endocrinology*

Prevalence of *KISS1 Receptor* mutations in a series of 603 patients with normosmic congenital hypogonadotrophic hypogonadism and characterization of novel mutations: a single-centre study

Bruno Francou[1,2,3], Charlotte Paul[2], Larbi Amazit[1,2], Alejandra Cartes[4], Claire Bouvattier[1,5], Frédérique Albarel[6], Dominique Maiter[7], Philippe Chanson[1,2,4], Séverine Trabado[1,2,3], Sylvie Brailly-Tabard[1,2,3], Thierry Brue[6], Anne Guiochon-Mantel[1,2,3], Jacques Young[1,2,3,4,†*], and Jérôme Bouligand[1,2,†]

Introduction de l'article *Francou et al. Hum Reprod. 2016*

Prévalence des mutations *KISS1R* dans une grande série de patients nCHH.

Après ce travail initial, nous avons voulu systématiser l'évaluation du rôle des mutations de *KISS1R* dans une large série de patients normosmiques. À ce stade, la prévalence faible des mutations de *KISS1R* n'était pas évaluée précisément car depuis la découverte initiale en 2003, seules deux études indépendantes ont séquencé *KISS1R* dans des cohortes de plus de 100 cas d'HHC, les autres études étant pour la plupart des descriptions de larges familles consanguines.

De plus, le mode de transmission génétique du CHH lié à *KISS1R* reste discuté par rapport aux hypothèses d'oligogénisme. Cette hypothèse a été démontrée pour des gènes affectant la migration des neurones à GnRH dans les CHH. Les études précédentes décrivaient différentes formes d'hypogonadismes (Syndrome de Kallmann, CHH acquis chez l'adulte, retards pubertaires) avec des études génétiques hétérogènes et parcellaires (gènes « Kallmann impliqués dans la migration neuronale »).

La réversibilité du phénotype est aussi une question qui reste en suspens suite à des descriptions de patients mutés pour le gène *TACR3*, un gène codant pour un autre récepteur à sept domaines transmembranaires exprimé par les neurones KNDy dans l'hypothalamus (exprimant à la fois la Kisspeptine et la Neurokinine B) et impliqué dans les nHHC.

Enfin la signalisation des Kisspeptines et de leur récepteur *KISS1R* est décrite comme essentielle dans le déclenchement de la puberté et au maintien de la pulsatilité de la GnRH à l'âge adulte mais présentée par plusieurs auteurs sans rôle dans la vie pré-pubertaire. Cette interprétation est discutable alors que plusieurs patients porteurs de signes de déficit gonadotrope durant la vie fœtale et néonatale (micropénis et cryptorchidie) ont été rapportés dans la littérature.

Notre étude concerne une large série de patients non apparentés atteints de nCHH *i.e.* évalués de façon homogène sur le plan endocrinien, olfactif et génétique (ensemble des gènes des nCHH testés) dans un même centre hospitalier. L'objectif principal de cette étude est de clarifier la distinction entre patients présentant un nCHH porteurs de variants rares de *KISS1R* sans lien avec le phénotype, de patients dont l'HHC est formellement lié à l'invalidation de *KISS1R*. Cela est un prérequis pour évaluer fidèlement la prévalence des formes génétiques de CHH liées à *KISS1R*. Il s'agit aussi, en analysant l'ensemble des gènes de CHH, d'explorer l'hypothèse de l'oligogènisme.

Copy Edited by: A.K.
Language used: UK/ize

Human Reproduction, Vol.0, No.0 pp. 1–11, 2016
Advanced Access publication on Month 00, 0000 doi:10.1093/humrep/dew073

human reproduction

ORIGINAL ARTICLE *Reproductive endocrinology*

Prevalence of *KISS1 Receptor* mutations in a series of 603 patients with normosmic congenital hypogonadotrophic hypogonadism and characterization of novel mutations: a single-centre study

Bruno Francou[1,2,3], Charlotte Paul[2], Larbi Amazit[1,2], Alejandra Cartes[4], Claire Bouvattier[1,5], Frédérique Albarel[6], Dominique Maiter[7], Philippe Chanson[1,2,4], Séverine Trabado[1,2,3], Sylvie Brailly-Tabard[1,2,3], Thierry Brue[6], Anne Guiochon-Mantel[1,2,3], Jacques Young[1,2,3,4,†*], and Jérôme Bouligand[1,2,†]

[1]Univ Paris-Sud, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France [2]INSERM Unité Mixte de Recherche 1185, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre F-94276, France [3]Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique, et Hormonologie, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France [4]Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction and Centre de Référence des Maladies Endocriniennes Rares de la Croissance, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France [5]Service d'Endocrinologie Pédiatrique and Centre de Référence des Maladies du Développement Sexuel, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France [6]Service d'Endocrinologie Hôpital de la Conception, Marseille, France [7]Département d'Endocrinologie, Métabolisme et Nutrition, Université catholique de Louvain, cliniques universitaires, Saint-Luc, Belgium

*Correspondence address. E-mail: jacques.young@aphp.fr

Submitted on December 23, 2015; resubmitted on February 27, 2016; accepted on March 11, 2016

STUDY QUESTION: What is the exact prevalence of *Kisspeptin Receptor* (*KISS1R*) mutations in the population of patients with normosmic congenital hypogonadotrophic hypogonadism (nCHH) by comparison with other genes, involved in gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) release or action?

SUMMARY ANSWER: *KISS1R* mutants are responsible for the nCHH phenotype in only a small minority of cases and were less prevalent than *GnRH Receptor* (*GNRHR*) mutations.

WHAT IS KNOWN ALREADY: The respective prevalence of each of the genetic causes of nCHH is unclear. Large series of patients are very rare and suffer from heterogeneity of the population of CHH studied.

STUDY DESIGN, SIZE, DURATION: Patients with nCHH were consecutively enrolled in a single French referral centre and were gradually tested for *KISS1R* between January 2006 and April 2015.

PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS: A total of 603 patients with nCHH (399 men and 204 women) were diagnosed at the Bicêtre Hospital and underwent *KISS1R* analysis. The *GNRHR*, tachykinin receptor 3 (*TACR3*), gonadotrophin-releasing hormone 1 (*GNRH1*), tachykinin 3 (*TAC3*) and *KISS1* genes were also sequenced. Functional characterization of *KISS1R* mutations included a study of signal transduction using a reporter gene (serum response element-luciferase (*SRE-Luc*) involved in the mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway.

MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE: We detected 15 *KISS1R* variants (10 novel), in 12 of the 603 patients (2.0%, 95% CI [0.9–3.1]. *KISS1R* mutations were less prevalent than *GNRHR* (4.7%) and *TACR3* (2.6%) mutations but more prevalent than *GNRH1* (1.5%), *TAC3* (1.0%) and *KISS1* (0%) mutations. *KISS1R* mutants were present in the biallelic state in 8 of the 12 patients concerned. Among 5 men with biallelic *KISS1R*

† These two senior authors contributed equally.

© The Author 2016. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society of Human Reproduction and Embryology. All rights reserved.
For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

mutations, 4 had either micropenis or cryptorchidism. *In vitro* analysis of the 5 new variants present in the biallelic state (C95W, Y103*, C115W, P176R and A287E) showed a loss of function.

LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION: The prevalence of *TACR3, GNRH1, TAC3* and *KISS1* mutations was calculated from a smaller number of nCHH patients than *KISS1R* and *GNRHR*. This should prompt caution concerning the reported prevalence of mutations in these four genes.

WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS: We show that KISS1R mutants are responsible for the nCHH phenotype in only a small minority of cases. Together, the genes analysed here were mutated in fewer than 15% of patients, suggesting a role of other genes in nCHH. The presence of cryptorchidism and/or micropenis in the majority of men with biallelic *KISS1R* mutations strongly suggests that this gene is essential for prenatal GnRH secretion.

STUDY FUNDING, COMPETING INTEREST(S): This work was supported in part by grants from Paris-Sud University (Bonus Qualité Recherche, and Attractivité grants) to J.B., French Ministry of Health, Hospital Clinical Research Program on Rare Diseases. Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC # P081212 HYPOPROTEO) to J.Y. C.P. was supported by student fellowships 'Année Recherche' from Agence Régionale de Santé Provence Alpes Côtes d'Azur. The authors have nothing to disclose.

Key words: GNRHR/GNRH1 / neurokinin B / TAC3/TACR3 / GPR54 / Kallmann / delayed puberty

Introduction

Congenital hypogonadotrophic hypogonadism (CHH) is a group of rare diseases (estimated prevalence about 1/8000) characterized by deficient or absent pubertal development due to deficient or absent secretion of the pituitary gonadotrophins LH and FSH (Brioude *et al.*, 2010; Young, 2012; Boehm *et al.*, 2015). The many known genetic causes are generally classified into two large, distinct nosological groups. One comprises abnormalities that affect the prenatal development or migration of GnRH neurons, the paradigm of which is Kallmann syndrome (Boehm *et al.*, 2015). The other encompasses molecular abnormalities that only affect hypothalamic gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) synthesis, release or signalling, without modifying the normal anatomical position of GnRH neurons or their axon terminals in the hypophyseal portal system (Brioude *et al.*, 2010). Patients in the latter group are characterized by the absence of neurological disorders; in particular, they have a normal sense of smell (Brioude *et al.*, 2010) and thus have normosmic CHH (nCHH). This latter group is subdivided into cases associated with molecular defects causing abnormal pituitary responsiveness to hypothalamic GnRH, such as loss-of-function mutations in the GnRH receptor (*GNRHR*) (de Roux *et al.*, 1997; Layman *et al.*, 1998), although there is no deficit in hypothalamic GnRH secretion. Knowledge of the genetic causes of nCHH has advanced rapidly over the past 20 years. The first *GNRHR* mutations were discovered 18 years ago in a subgroup of nCHH patients, while mutations of the gene that encodes its ligand, GnRH, were described more recently (Bouligand *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2009; Maione *et al.*, 2013). Meanwhile, the discovery of unexpected genetic causes has revealed new molecules that play a crucial physiological role in human hypothalamic GnRH secretion, namely the neuropeptide kisspeptin (Topaloglu *et al.*, 2012) and its receptor *KISS1R* (Seminara *et al.*, 2003; de Roux *et al.*, 2003; Semple *et al.*, 2005; Lanfranco *et al.*, 2005; Cerrato *et al.*, 2006; Pallais *et al.*, 2006; Tenenbaum-Rakover *et al.*, 2007; Teles *et al.*, 2010; Nimri *et al.*, 2011; Breuer *et al.*, 2012; Brioude *et al.*, 2013; Chevrier *et al.*, 2013; Miraoui *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2015; Demirbilek *et al.*, 2015), as well as neurokinin B and its receptor tachykinin receptor 3 (TACR3) (Topaloglu *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2010; Gianetti *et al.*, 2010; Francou *et al.*, 2011).

The respective prevalence of each of these genetic causes of nCHH is unclear. Indeed, large series of patients are very rare (Bhagavath *et al.*, 2006; Sykiotis *et al.*, 2010), and some suffer from a recruitment bias or from a heterogeneity of the population of CHH studied. Inclusion of different ethnic populations and patients of different geographic origin are a further source of uncertainty. Hence, the importance of large independent series including homogeneous and well-characterized patients. Q1

The aim of this study was to determine the frequency of *KISS1R* mutations, by comparison with *GNRHR, TACR3, GNRH1, KISS1* and *TAC3* mutations, in a large homogeneous series of nCHH patients analysed at the Bicêtre Hospital in France. Among the 10 new *KISS1R* mutations identified here, 6 mutations were present in the biallelic state. Among the latter, we functionally characterized missense and nonsense mutations.

Materials and Methods

Ethical approval

All the patients gave their written informed consent for clinical, hormonal and genetic analyses, in keeping with French Bioethics Law and the Declaration of Helsinki, and with the approval from the Bicêtre Hospital ethics committee (Comité de protection des personnes Ile de France, Hôpital Bicêtre).

Patients

We studied 603 nCHH patients (399 males and 204 females) who were referred to the Reproductive Endocrinology Department at Bicêtre Hospital in Paris, France, and were gradually tested for *KISS1R* mutations between January 2006 and April 2015. In patients harbouring uncommon variants, ethnicity was specified. These patients' isolated congenital gonadotrophin deficiency was characterized by (i) absent or incomplete puberty at age 17 years; (ii) low serum testosterone (males) or oestradiol (females) levels with low or normal serum gonadotrophin levels; (iii) normal basal and stimulated levels of cortisol, growth hormone (GH), prolactin (PRL) and thyroid-stimulating hormone (TSH) in response to insulin-induced hypoglycaemia or thyrotropin-releasing hormone (TRH), with normal basal serum dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and thyroid hormone levels; (iv) normal serum IGF-I levels for age, with normal iron and ferritin concentrations; and (v) normal magnetic resonance imaging of the hypothalamic–pituitary region (Young, 2012). We excluded all patients with Kallmann syndrome (CHH associated with anosmia/hyposmia and/or olfactory bulbs/tracks anomalies on MRI).

All the 603 nCHH included patients were tested for *KISS1R*, whereas *GNRHR* was analysed in 594 of them (98.5%). From these 603 nCHH

patients, 391 (65%) also underwent sequencing of both *TAC3* and *TACR3*. Finally, *GNRH1* and *KISS1* were, respectively, analysed in 460 (76.3%) and 307 (51%) of these 603 nCHH patients.

DNA analysis

Genomic DNA was extracted from white blood cells with standard procedures (Bouligand *et al.*, 2009). Sequencing was performed in both strands by BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and analysed on the Seqscape software (Applied Biosystems). All five *KISS1R* (NM_032551.4) coding exons and intron–exon junctions were amplified by PCR and sequenced as described previously (de Roux *et al.*, 2003; Brioude *et al.*, 2013). Sequence variations were found on both strands and confirmed in a separate PCR analysis.

All three coding exons and intron–exon junctions of *GNRHR* (*Gonadotrophin Releasing Hormone Receptor*, NM_000406.2) were amplified by PCR and sequenced as described previously (de Roux *et al.*, 1997; Tello *et al.*, 2012). Sequence variations were found on both strands and confirmed in a separate PCR analysis.

Coding exons 2–4 and intron–exon junctions of *GNRH1* (*Gonadotrophin Releasing Hormone 1*, NM_001083111.1) were amplified by PCR and sequenced as described previously (Bouligand *et al.*, 2009; Maione *et al.*, 2013). Sequence variations were found on both strands and confirmed in a separate PCR analysis.

Coding exons 2–6 of *TAC3* (Tachykinin 3, NM_013251.3), all exons of *TACR3* (Tachykinin receptor 3, NM_001059.2) and intron–exon junctions were amplified by PCR and sequenced as described previously (Young *et al.*, 2010; Francou *et al.*, 2011). Sequence variations were found on both strands and confirmed in a separate PCR analysis.

Coding exons 2 and 3 and intron–exon junctions of *KISS1* (kisspeptin, NM_002256.3) were amplified by PCR and sequenced as previously described (Topaloglu *et al.*, 2012), with minor modifications. Sequence variations were found on both strands and confirmed in a separate PCR analysis.

Multiplex ligation-dependent probe amplification assay

When segregation studies were not available, multiplex ligation-dependent probe amplification assay (MLPA) was applied to genomic DNA to exclude a *KISS1R* deletion and demonstrate the homozygous status of variants. For that purpose, we use the SALSA P133-C1 Kallmann-2 MLPA kit (MRC Holland, Amsterdam, the Netherlands) according to the manufacturer's protocol. This kit contains probes for *KISS1R* (NM_032551.4, exons 1, 4 and 5), among other genes. Analysis was based on the examination of the capillary electrophoresis peak profiles generated by Genemapper v4.1 software (Applied Biosystems) and gene dosage using Coffalyser 9.0 software (MRC Holland), by comparison with the control sample. Gene dosage quotients between 0.8 and 1.2 were considered disomic.

Hormone assays

Immunoradiometric assay, enzyme-linked immunoabsorbent assay or radioimmunoassay was used to measure serum levels of LH, FSH, inhibin B, plasma testosterone and oestradiol, as described previously (Young *et al.*, 2010; Francou *et al.*, 2011).

Functional studies

Plasmids and directed mutagenesis

KISS1R mutants were reproduced by site-directed mutagenesis, using the pcDNA3.1+ plasmid encoding human *KISS1R* (Missouri S&T cDNA Resource Center) and the QuickChange Stratagen II kit (Stratagen, La Jolla, CA). KISS1R wild-type (WT) pcDNA3.1+ and the pCMV-HA-N plasmid (Clontech Laboratories, Moutain View, CA, USA) were digested with *Eco*RI and *Xho*I. The KISS1R WT insert was cloned into a pCMV-HA-N plasmid. Site-directed mutagenesis was used to delete two nucleotides in the hinge region between the haemagglutinin (HA) tag and KISS1R insert, in order to place the two sequences in-frame, resulting in a new vector pCMV-HA-KISS1R. This construct encodes the *KISS1R* cDNA tagged with an N-terminal HA epitope. This new plasmid and the *KISS1R* mutant pcDNA3.1+ plasmids were digested with *Dra*III and *Xho*I. *KISS1R* mutant inserts were cloned into the new tagged vector. All plasmids were checked by Sanger sequencing.

Luciferase reporter gene assay

After WT and KISS1R-mutated vectors transfection in HEK 293T cells, luciferase reporter gene assay was performed as previously described (Francou *et al.*, 2011; Brioude *et al.*, 2013). Kisspeptin protein-coupled receptors signal through several second-messenger pathways, including the phosphoinositide and MAP kinase pathways (ERK 1/2). We thus used the luc2P/SRE/Hygro plasmid (Promega, Charbonnières Les Bains, France), which induces luciferase production in response to MAP kinase activation (Francou *et al.*, 2011).

Immunocytochemistry and fluorescence deconvolution microscopy

COS-7 cells were grown in 24-well plates containing 14-mm-diameter glass coverslips and were chosen instead of HEK293T because of better performance in terms of adhesion for immunocytochemistry studies. After 24 h of transfection with the expression vector coding for HA-KISS1R, cells were processed as described previously (Amazit *et al.*, 2007; Francou *et al.*, 2011). Briefly, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized for 10 min with 0.2% Triton X100 in PBS. Cells were then incubated overnight at 4°C with an anti-HA antibody (clone 3F10, Roche Applied Science, Mannheim, Germany), followed by 30-min incubation with an anti-rat Alexa 555-coupled secondary antibody (Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France). After primary and secondary antibody labelling, cells were post-fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde. Nuclear counterstaining was performed with 0.5 μg/ml DAPI, and coverslips were mounted on slides with ProLong Gold mounting medium (Life Technologies SAS).

For live-cell imaging of HA-KISS1R, transfected cells were incubated for 2 h with the rat anti-HA antibody at 37°C (dilution in cell culture medium), then fixed with 4% paraformaldehyde and treated with the secondary antibody and DAPI as described above. Fluorescence deconvolution microscopy was performed using Image-Pro Plus AMS software (Media Cybernetics, Inc., Marlow, UK) on a Mono Q Imaging Retiga 2000R Fast 1394 camera (Q Imaging Inc., Surrey, BC, Canada). Cells were observed and acquired with an automated upright BX61 microscope (Olympus, Rungis, France) equipped with an ×100 objective (1.4 NA). A *z*-series of focal planes was digitally imaged and deconvolved with the 3D blind iterative algorithm (Image-Pro Plus AMS) to generate high-resolution images.

Results

The following results exclude frequent variants (minor allele frequency, MAF, >1% in the corresponding ethnic group in the Exome Aggregation Consortium (ExAC) database), which we considered to be polymorphisms (see below and Supplementary Material). Only rare variants are therefore described. MLPA excluded KISS1R microdeletions in probands 1 and 2.

Prevalence of KISS1R rare variants

KISS1R was analysed in 603 patients, and at least one mutation was found in 12 patients, for a prevalence of 2.0% (95%CI [0.9–3.1]).

Fifteen different *KISS1R* rare variants were found (Table I), comprising 2 nonsense mutations, 11 missense mutations, 1 splice-site mutation, and 1 mutation that abolished the natural stop codon (Table I). Ten of these mutations were new, four were recurrent (Seminara *et al.*, 2003; Pallais *et al.*, 2006; Tenenbaum-Rakover *et al.*, 2007) and one already reported (Brioude *et al.*, 2013). Eight of these 12 patients harboured *KISS1R* rare variants in the biallelic (homozygous or compound heterozygous) state (Table II).

Prevalence of rare variants of other genes implicated in nCHH

As stated above, in all the 603 nCHH patients included, a *KISS1R* sequencing was carried out. Among these 603 patients, 594 also had a *GNRHR* sequencing and 391 also had both a *TAC3* and a *TACR3* sequencing. Similarly, molecular analysis of *GNRH1* and *KISS1* were, respectively, performed in 460 and 307 of the 603 nCHH patients. We found rare variants of these analysed genes in 53 nCHH patients. The genotypes of these patients are described in Supplementary data, Table SI.

In brief, (i) *GNRHR* mutations were sought in 594 nCHH patients, revealing variants in 28 patients (prevalence 4.7%, 95%CI [3.0–6.4%]). In 64% of cases (18/28), the rare variants were present in the biallelic (homozygous or compound heterozygous) state (Supplementary data, Table SI). (ii) *TACR3* variants were found in 14 patients (6 in the biallelic state) among the 391 patients analysed, for a prevalence of 3.6% (95%CI [1.7–5.4%]). Only 4 patients (2 in the biallelic state) harboured *TAC3* variants (1.0%, 95%CI [0.0–2.0%]). (iii) The *GNRH1* gene was analysed in

Table I Fifteen KISS1R rare variants identified in 603 normosmic CHH patients.

Protein mutation	cDNA mutation	Protein localization	ExAC (%): All - Subclass	Bioinformatic prediction	Functional analysis	References
Found in biallelic state						
p.?	c.244+5G>A	–	ALL:A = 0.00% – NFE:0.0023%	MES −15%, SSF −15%	ND	Novel – present study
p.Cys95Trp	c.285C>G	TM2	ALL:G = 0.01% – NFE:0.00%	S: D = 0, PP2: PbD = 1.000	No response in luciferase assays	Novel – present study(1)
p.Leu102Pro	c.305T>C	TM2	Absent	S: D = 0, PP2: PD = 0.949	decrease of IP accumulation	(2, 3)
p.Tyr103*	c.309C>A	ECL1	Absent	–	No response in luciferase assays	Novel – present study(1)
p.Cys115Trp	c.345C>G	ECL1	Absent	S: D = 0, PP2: PbD = 1.000	No response in luciferase assays	Novel – present study(1)
p.Leu148Ser	c.443T>C	ICL1	Absent	S: D = 0, PP2: PbD = 0.998	decrease of IP accumulation	(4, 5)
p.Pro176Arg	c.527C>G	TM4	Absent	S: T = 0.06, PP2: PbD = 1.000	No response in luciferase assays	Novel – present study(1)
p.Ala287Glu	c.860C>A	ECL3	Absent	S: D = 0, PP2:B = 0.221	Shifted response in luciferase assays	Novel – present study(1)
p.Tyr313His	c.937T>C	TM7	ALL: C = 0.00%– NFE: 0.003214%	S: D = 0, PP2:PbD = 1.000	no phosphorylation of ERK1/2, Ca^{+} mobilization: low activity, No response in luciferase assays.	(2)
p.Arg331*	c.991C>T	C-Ter	Absent	–	No response in luciferase assays, decrease of IP accumulation.	(4, 5)
p.*399Argext*161	c.1195T>A	C-Ter	ALL:A = 0.04%– NFE:0.06766%	–	decrease of IP accumulation	(2, 4)
Found in monoallelic state						
p.Arg38Pro	c.113G>C	N-ter	Absent	S: D = 0, PP2: B = 0.000	ND	Novel – present study
p.Pro46Gln	c.137C>A	N-ter/TM1	Absent	S: D = 0, PP2: PbD = 1.000	ND	Novel – present study
p.Ser125Leu	c.374C>T	TM3	Absent	S: D = 0, PP2: PbD = 0.995	ND	Novel – present study
p.Arg198Gly	c.592C>G	ECL2	Absent	S: T = 0.19, PP2: B = 0.152	ND	Novel – present study

ExAC ALL, global frequency among subclass; AFR, African; AMR, Latino; EAS, East Asian; SAS, South Asian; NFE, European (non-Finnish) FIN', European (Finnish); OTH, others; TM, transmembrane domain; ECL, extracellular loop; ICL, intracellular loop; N-Ter extracellular N-terminal domain; C-Ter, cytoplasmic carboxy terminal domain; ND, not determined; Prediction for missense: S, SIFT; D, deleterious; T, tolerated, = score/PP2, Polyphen 2; PbD, probably damaging; PB, possibly damaging; B, benign, = score.

Table II Characteristics of 12 nCHH patients with KISS1R mutations.

Noof proband	Gender	Ethnicity	Sporadic (S) or familial (F)	Age at diagnosis (years)	Current age (years)	Reproductive phenotype at diagnosis	Baseline LH/FSH (IUI)	GnRH stimulation test (peak LH/FSH)	Ostradiol (E2) pg/mL Testosterone (T) ng/ml	Inhibin B (pg/ml)	RMI brain/pituitary	Olfactometry/olfactory bulbs (OB)	Genotype
Patients with biallelic variants													
1	Male	Caucasian	S	16	32	VT: 2 ml cryptorchidism	0.2/0.5	NA	–/T: 0.6	11	nl/nl	nl/nl OB	c.[244+5G>A];[244+5G>A]
2	Female	Caucasian	S	16	32	B2/P3 PA	0.1/0.7	0.8/0.2	E2: 7.0/–	7	nl/nl	nl/nl OB	c.[285C>G];[285C>G]
3*	Male	Caucasian	S	19	22	VT: 2 ml micropenis	0.15/0.2	1.3/1.1	–/T: 0.25	25	nl/nl	nl/nl OB	c.[305T>C];[1195T>A]
4	Male	Caucasian	S	18	25	VT: 4 ml micropenis	1.2/1.0	NA	–/T: 0.6	92	nl/nl	nl/nl OB	c.[309C>A];[860C>A]
5	Male	Caucasian	S	33	41	VT: 2.2 ml cryptorchidism left micropenis	0.6/0.8	NA	–/T: 0.5	NA	nl/nl	nl/nl OB	c.[345C>G];[991C>T]
6	Female	Caucasian	F	17	25	B1/P2 PA	0.7/0.9	NA	E2: 12/–	NA	nl/nl	nl/nl OB	c.[443T>C];[443T>C]
7	Female	Caucasian	S	17	23	B2/P2 PA	0.7/3.5	10.5/11	E2:7.0/–	5	nl/nl	nl/nl OB	c.[527C>G];[527C>G]
8*	Male	Caucasian	F	55	58	VT: 2.5 ml micropenis	0.2/0.1	5.1/4.1	–/T: 0.2	17	nl/nl	nl/nl OB	c.[937T>C];[937T>C]
Patients with monoallelic variants													
9	Female	Caucasian	S	17	50	B1/P1 PA	0.5/0.9	8.0/9.0	E2:16/–	NA	nl/nl	nl/nl OB	c.[113G>C];[=]
10	Female	Caucasian	S	17	37	B2/P2 PA	4.1/5.2	NA	E2:10/–	10	nl/nl	nl/PSI OB	c.[137C>A];[=]
11	Female	Caucasian	S	16	23	B3/P4 PA	0.2/0.4	5.4/21	E2:14/–	8	nl/nl	nl/nl OB	c.[374C>T];[=]
12	Male	Caucasian	S	48	73	VT: 6 ml micropenis	0.3/0.4	NA	–/T: 0.22	NA	nl/nl	nl/nl OB	c.[592C>G];[=]

VT, mean testicular volume; B, breast development (Tanner); P, pubic hair development; nl, normal; NA, not available; PA, primary amenorrhoea; PSI, pituitary stalk interruption; E2, oestradiol normal range female: 12–41 pg/ml; T, testosterone normal range men: 3.2–8.9 ng/ml; Prediction for splice site: MES MaxEnt Scan, SSF SpliceSite Finder.
(1) See also Fig. 3; (2) Brioude *et al.* (2013); (3) Tenenbaum-Rakover *et al.* (2007); (4) Seminara *et al.* (2003); (5) Pallais *et al.* (2006).
[a]Two patients previously reported in Brioude *et al.*

460 patients, revealing variants in 7 patients (1 in the biallelic state) (prevalence 1.5%, 95%CI [0.4–2.6]). (iv) *KISS1* was analysed in 307 patients and no rare variants were found.

Prevalence of *KISS1R* rare variants versus *GNRH1/GNRHR*, *TAC3/TACR3* and *KISS1* rare variants in nCHH patients (Fig. 1)

Overall, 10.3% of the patients analysed carried at least one rare variant of one of the six genes analysed. The prevalence of rare *KISS1R* variants was less than half that of *GNRHR* variants (12/603 versus 28/594), slightly lower than that of *TACR3* variants (10/391), and higher than that of the genes encoding the neuropeptide ligands of these receptors: *GNRH1*: 7/460, *TAC3*: 4/391, *KISS1*: 0/307.

Characterization of the new KISS1R mutants

Among the 15 *KISS1R* rare variants identified here (Table I), 4 were in the monoallelic state and 11 in the biallelic state (Table II). Ten of these 15 variants were novel (Fig. 2).

Probands' pedigrees described in Table II are shown in Fig. 3 and Supplementary data, Figure S1.

Six of these 10 novel rare variants were not present in the ExAC database (Exome Aggregation Consortium, Cambridge, MA, USA, http://exac.broadinstitute.org [July 2015]), showing that they are extremely rare. The other four were present in the ExAC database but at frequencies below 0.07% (Table I).

The novel rare variants included a nonsense mutation, Y103*, located in the first extracellular loop, completely altering the structure of the receptor (Table I) by deleting five transmembrane domains (Fig. 2). We describe, for the first time, a c.244+5G>C mutant, predicted with high probability by both MaxEntScan and SpliceSiteFinder (Table I) to affect splicing. To specify the *in vivo* consequences of this mutation, a splicing analysis from patient's cells would have been necessary (Young *et al.*, 2010). Unfortunately, the patient refused the additional sample required to perform this study.

We also discovered eight missense variants; four of which (P46Q, C95W, C115W and S125L) are predicted to be detrimental by SIFT and Polyphen2 (Table I). In particular, the C115W variant prevents the formation of a disulfide bond in the extracellular portion of the receptor. Bioinformatic analyses gave conflicting predictions for three other missense mutations (R38P, P176R and A287E). Finally, another very rare variant (Arg198Gly) was predicted by both programs to be 'tolerated.'

Among the 11 variants found in the biallelic state, we conducted *in vitro* analyses of the five novel point mutations (C95W, Y103*, C115W, P176R and A287E) (Table I). As shown in Fig. 3, these five mutations were effectively found to alter the receptor signalling. The A287E mutant was particularly interesting: despite discordant bioinformatic predictions, *in vitro* characterization showed a clear loss of function (Fig. 3C). This novel mutant leads to the substitution of a single amino acid at the beginning of the third extracellular loop of the receptor; the function and structure of which are unclear.

To better understand the mechanism by which this A287E mutant causes a loss of receptor function, we compared its membrane distribution and intracellular retention with that of the WT receptor, using immunocytofluorescence to detect HA-tagged receptors. Receptors located on the membrane were immunodetected with an anti-HA antibody in living, non-permeabilized cells, while the intracellular portion of the receptor was identified with the same antibody in permeabilized cells. In living cells, the A287E mutant receptor was not detected at the plasma membrane, whereas the WT receptor was abundant (Fig. 4A). The same experiments

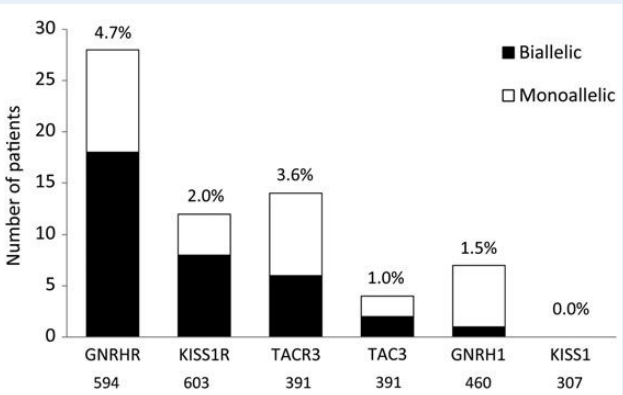


Figure 1 The number of patients with monoallelic and biallelic rare protein-altering variant in each nCHH gene. Bars are ordered decreasingly based on the number of patients carrying biallelic rare variants for each indicated gene: *GNRHR*: 18; *KISS1R*: 8; *TACR3*: 6; *TAC3*: 2; *GNRH1*: 1; *KISS1*: 0. Numbers below bars indicate the number of patients screened for the corresponding gene. Numbers above bars are the frequency of rare variants in patients screened for the gene.

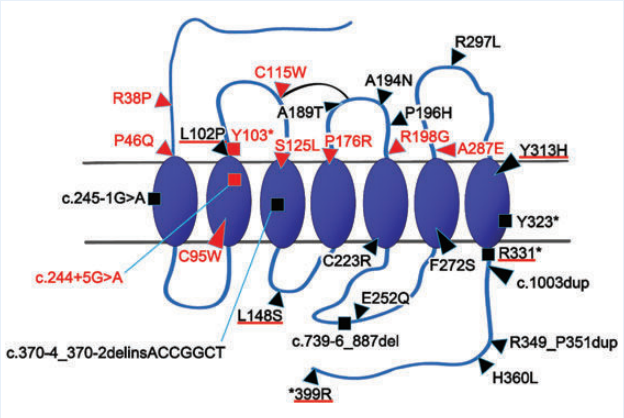


Figure 2 Schematic KISS1R with novel and published mutations identified in CHH patients. Coloured in red for original variants and in black for previously described mutations. Underlined in red are mutations found in our series but already reported by us and others (recurrent) (Seminara *et al.*, 2003; Pallais *et al.*, 2006; Tenenbaum-Rakover *et al.*, 2007; Brioude *et al.*, 2013). Squares stand for nonsense mutations, triangles stand for missense mutations. All these mutations are indicated in accordance with Human Genome Variation Society (HGVS) nomenclature. The four mutations listed below are also indicated as initially published (shown in brackets). R349_P351dup (PRR repeat, Chevrier *et al.*, 2013) ; c.1003dup (c.1001_1002insC, Lanfranco *et al.*, 2005) ; c.739−6_887del (155 bp deletion, de Roux *et al.*, 2003) ; c.370-4_370-2delinsACCGGCT (IVS2 -2_-4 delGCA insACCGGCT, Teles *et al.*, 2010).

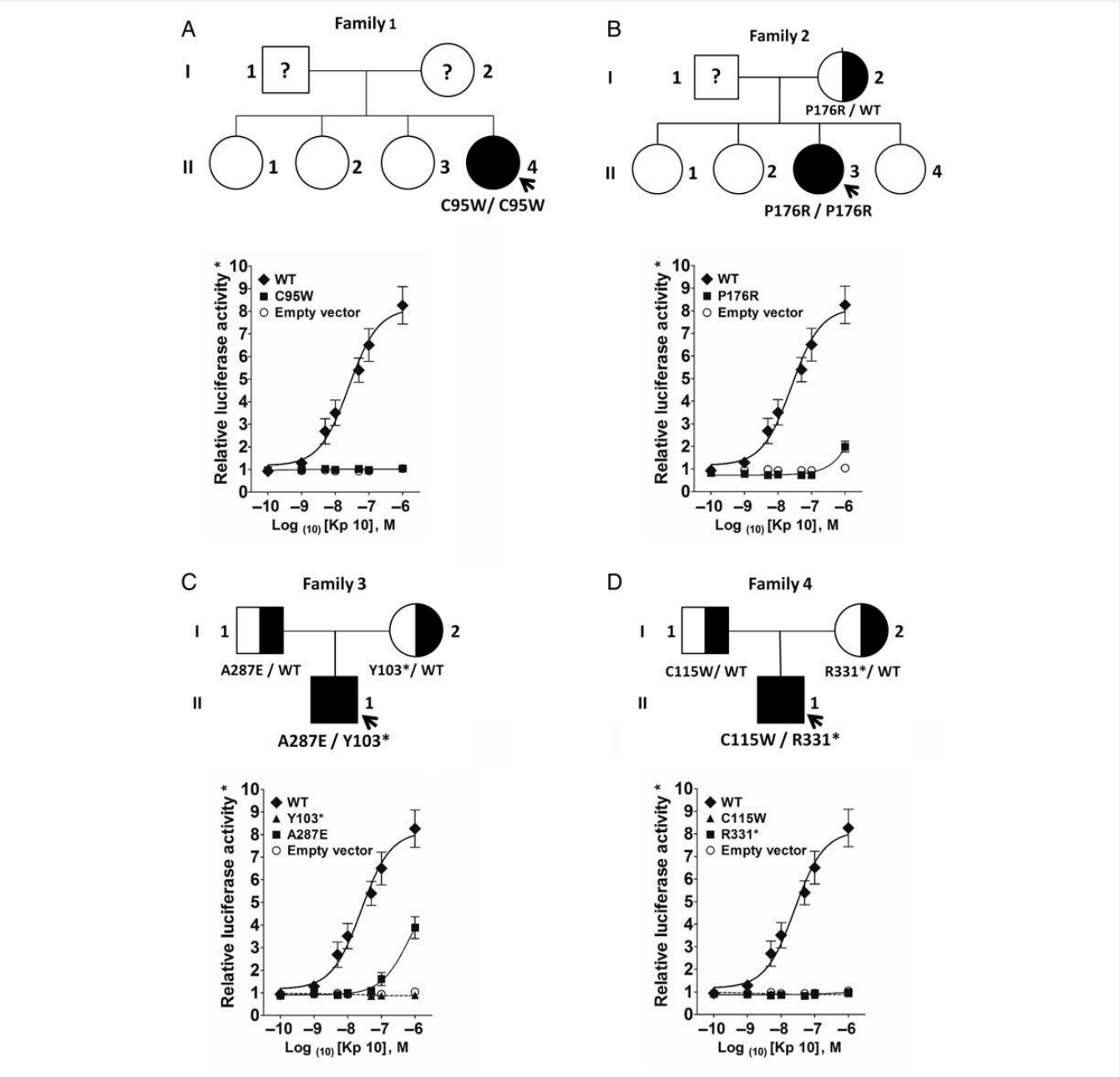


Figure 3 Family pedigrees with corresponding *KISS1R* mutations and functional analyses. Solid symbols indicate affected subjects and half-shaded symbols indicate unaffected heterozygotes. Circles represent female family members and squares male family members. Asterisks (*) in *y* axes indicate the relative luciferase activity calculated as the ratio of luciferase values in the presence of ligand compared with the values obtained in the absence of ligand. (**A**) The proband, subject II-4 (see also Table II, patient 2), is homozygous for a mutation affecting a conserved amino acid in the second transmembrane domain (C95W). (**B**) The proband, subject II-3 (Table II, patient 4), is homozygous and the unaffected mother (I-2) was heterozygous for a substitution affecting a conserved amino acid in the fourth transmembrane domain (P176R). (**C**) The proband, subject II-1 (Table II, patient 5), was compound heterozygous for *KISS1R* mutations Y103*/A287E. The unaffected father (I-1) was heterozygous for the A287E mutation and the unaffected mother was heterozygous for the Y103* mutation. The Y103* produces a stop codon in the first extracellular loop of KISS1R. The A287E substitution affects an amino acid in the third extracellular loop. (D) The proband, subject II-1 (Table II, patient 6), was compound heterozygous for C115W/ R331* *KISS1R* mutations. The unaffected father (I-1) was heterozygous for the C115W mutation and the unaffected mother was heterozygous for the R331* mutation. The C115W substitution affects an amino acid in the first extracellular loop. The R331* substitution produces a stop codon in the C-terminal intracellular tail of KISS1R. In the lower part of (A–D) are shown Kisspeptin-10 (Kp10) dose–responses of the reporter luc2P/SRE. Increasing concentrations of Kp10 led to an increase in the luciferase activity of WT KISS1R (black diamonds). The KISS1R mutants showed a dramatic decrease in luciferase activities (squares and triangles). Open circles indicate the empty vector.

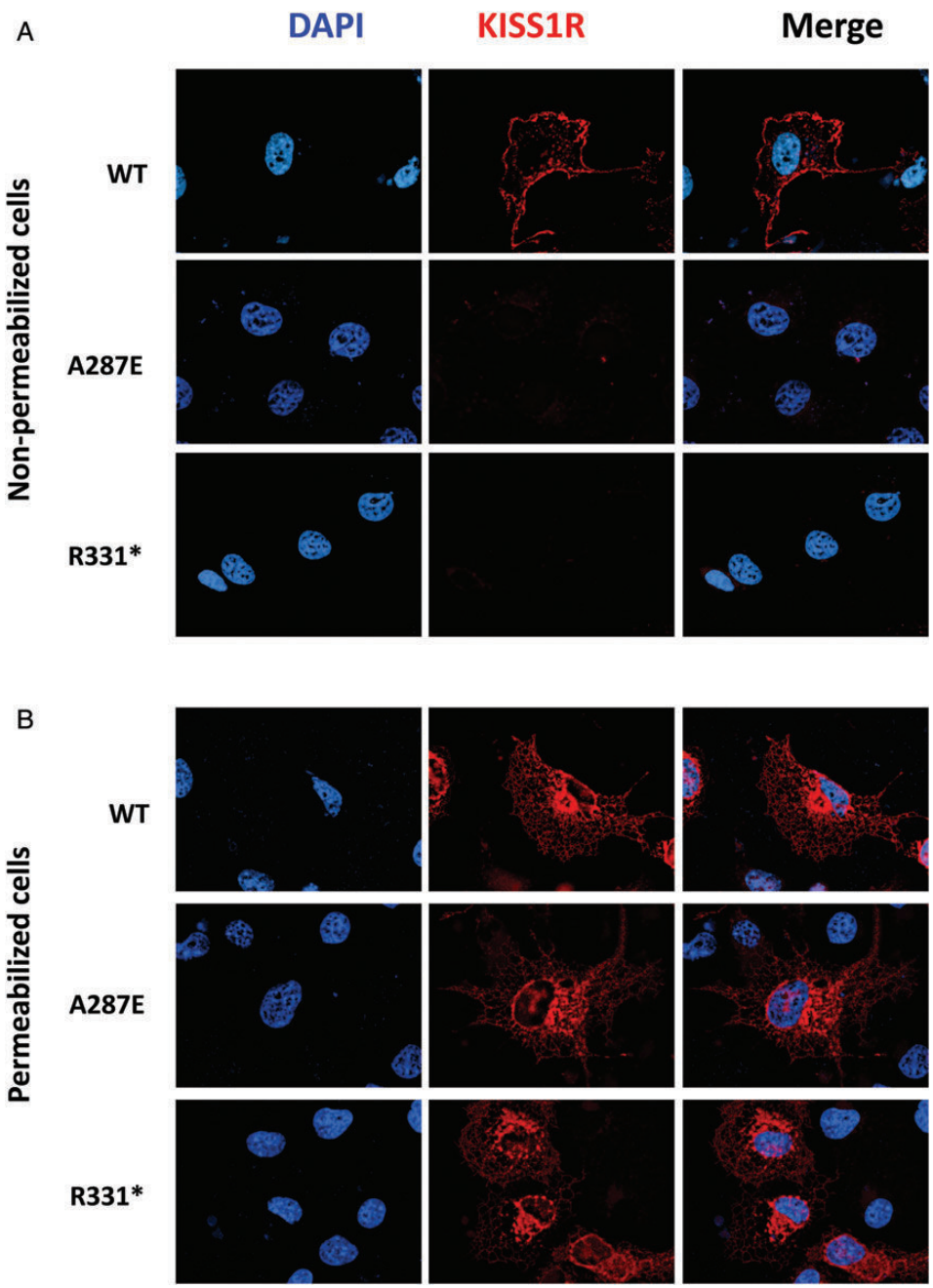


Figure 4 Subcellular localization of WT, A287E and R331* KISS1R mutants. COS-7 cells were transfected with the expression vector indicated and the immunodetection was performed using anti-HA antibody as described in the Materials and Methods section. The nuclei are counterstained by DAPI (blue) and immunofluorescence of the HA-conjugated receptor is shown in red. z-Series of the focal plane projection of KISS1R distribution in non-permeabilized (**A**) and permeabilized (**B**) cells were acquired and deconvolved to generate high-resolution images as detailed in methods section.

carried out with permeabilized cells showed that the WT and mutant receptors were both expressed and that they localized in the perinuclear region as well as in a cross-linked interconnected cytosolic network corresponding to the endoplasmic reticulum (polygonal tubules and cisternae) (Fig. 4B). As a pathological control, we performed the same experiment with the recurrent R331* mutant (Seminara *et al.*, 2003; Pallais *et al.*, 2006), the subcellular localization of which has already been described by Pampillo *et al.* (2009) and which was also found in our series (Table I). Like these latter authors, we found that membrane trafficking of this mutant was defective.

Phenotype of patients with biallelic mutations

All the patients with biallelic mutations had normal olfaction and no clinical manifestations other than their gonadal abnormalities (Brioude *et al.*, 2010). Their pituitary MRI was normal (Brioude *et al.*, 2010) and their hormonal findings were typical of CHH (Young, 2012; Boehm *et al.*, 2015).

Interestingly, two of the three men with biallelic *KISS1R* mutations had cryptorchidism and one had micropenis. If we include our two previously reported male cases (Brioude *et al.*, 2013), four out of five men with biallelic *KISS1R* mutations had either micropenis or cryptorchidism, representing a very high prevalence (80%) of these clinical manifestations.

The three women with biallelic *KISS1R* mutations had either absent or subnormal breast development. Genetic and phenotypic data on these new cases of biallelic *KISS1R* mutation are shown in Table II.

Discussion

We studied the prevalence of mutations in the six genes involved specifically in isolated non-syndromic CHH (Brioude *et al.*, 2010), in a population of nCHH patients living in France and evaluated in our referral centre. To our knowledge, this is the largest such study of nCHH patients. Overall, we found that rare variants of these genes were present in 10% of patients. Most of the patients with *KISS1R* and *GNRHR* mutations carried them in the biallelic state, in keeping with autosomal-recessive transmission of both genetic forms (Seminara *et al.*, 2003). In the minority of patients with monoallelic rare variants of these genes, other mutated genes likely contribute to the phenotype, within a context of oligogenism (Sykiotis *et al.*, 2010; Miraoui *et al.*, 2013). The proportion of patients with biallelic *KISS1R* mutations found here was significantly higher than that reported by Sykiotis *et al.* (2010). This difference may be related to the fact that we studied patients only with normal sense of smell. Our exclusion of Kallmann patients (representing 50% of patients in Sykiotis' series) (Sykiotis *et al.*, 2010) may have reduced the number of subjects with monoallelic rare variants in a context of oligogenism.

Relatively few *KISS1R* rare variants were found here, although their frequency was higher than that was reported by Sykiotis *et al.* (2010). This indicates that *KISS1R* mutations contribute to the nCHH phenotype in a minority of patients. Indeed, only 19 different *KISS1R* loss-of-function mutations have been identified because this receptor was first implicated in neuroendocrine control of GnRH secretion (Seminara *et al.*, 2003; de Roux *et al.*, 2003; Semple *et al.*, 2005; Lanfranco *et al.*, 2005; Cerrato *et al.*, 2006; Pallais *et al.*, 2006; Tenenbaum-Rakover *et al.*, 2007; Teles *et al.*, 2010; Nimri *et al.*, 2011; Breuer *et al.*, 2012; Brioude *et al.*, 2013; Chevrier *et al.*, 2013; Miraoui *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2015; Demirbilek *et al.*, 2015). The 10 new *KISS1R* mutations described here will significantly help to understand the structure–function relationships of this receptor.

The most frequently mutated gene in this series was *GNRHR*, followed by *KISS1R* and *TACR3*. The relative frequencies of identified *KISS1R* and *GNRHR* mutations seem even more reliable since the analyses of these two genes were performed, with a few exceptions, in the same patients. The prevalence of *GNRHR* mutations was higher than that was reported by Sykiotis *et al.* (2010). However, the same team subsequently observed a higher frequency in a study that probably included many of the same patients as well as patients with other disorders such as functional hypothalamic amenorrhoea, constitutional delay of puberty and adult onset (Gianetti *et al.*, 2012). The frequency of *GNRHR* mutations was relatively high in two other independent series (Bhagavath *et al.*, 2006; Beneduzzi *et al.*, 2014), suggesting that *GNRHR* is the first gene that should be analysed in patients with nCHH.

The frequency of *TACR3* mutations was lower than that was reported by Gianetti and co-workers, who studied 345 nCHH patients of North American or Brazilian origin (Gianetti *et al.*, 2010; Tusset *et al.*, 2012).

Our work also suggests that the frequency of *KISS1R* mutations was lower than of *TACR3*. However, the number of patients analysed for *TACR3* was lower than that of patients who underwent *KISS1R* sequencing. This is a weakness of our work because we cannot exclude that *TACR3* analysis in a larger number of patients from this series could change the prevalence of mutations of this gene.

Finally, the prevalence of mutations in the genes that encode ligands for these receptors (*GNRH1*, *KISS1* and *TAC3*) was lower, below 1.5% in each case. This difference between the receptors and their ligands may be due simply to the larger size of the coding regions in the receptor genes. Yet, here again, the lower number of patients tested could limit the accuracy of the reported frequencies.

We decided to test the mutated receptors detected in the biallelic state in our patients, regardless of the results of bioinformatic prediction, given the strong presumption that these variants contribute to the nCHH phenotype. Indeed, although predictive software is valuable, it is known to give many false positives (i.e. to predict a deleterious effect of receptor mutations that do not result in functional impairment *in vitro*) and even more false negatives (Min *et al.*, 2015). Hence the importance of functional analysis in prevalence studies. We found that two mutants led to loss of function *in vitro*, whereas one of the two software programs predicted no functional consequences. We therefore agree fully with Min *et al.* (2015), who recommend functional tests to confirm or rule out pathogenicity. Q2

Concerning the biallelic c.244+5G>C splicing mutation, although bioinformatics predictions of canonical splice sites are usually reliable, a formal demonstration by analysis of patient's transcripts (Young *et al.*, 2010) would have been necessary. Unfortunately, the patient refused the additional sample required to perform this demonstration.

We found that a new A287E *KISS1R* mutant led to defective membrane trafficking. Classically, the loss of function due to this point mutation might involve defective ligand binding, coupling (Ahow *et al.*, 2014) or membrane trafficking. The resulting amino acid substitution occurs in the third extracellular loop, which is not, *a priori*, located in a region critical for correct receptor folding, contrary to the transmembrane domains (TMD). The alpha helices of these TDM are highly constrained, and the predictions made by programs such as SIFT and Polyphen2 for missense mutations in transmembrane domains are usually in line with the results of functional tests. We obtained conflicting predictions for the A287E mutant, meaning that the trafficking defect observed *in vitro* was unexpected.

No olfactory abnormalities have been reported in *KISS1R* knockout mice (Funes *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003; Dungan *et al.*, 2007), and all eight nCHH patients with biallelic KISS1R mutations reported here had a normal sense of smell. This is in keeping with the literature, as all patients described to date with biallelic *KISS1R* mutations have had normal olfaction. All these data support the notion that *KISS1R* is not involved in the development of the mammalian olfactory system. Likewise, the only clinical abnormalities found in these patients concerned the reproductive system.

One particularly interesting finding is that four of the five men with biallelic *KISS1R* mutations had micropenis and two had cryptorchidism. These clinical manifestations indicate the existence of a gonadotrophin deficiency that started in foetal and neonatal life (Bouvattier *et al.*, 2011). Other *KISS1R*-mutated patients with cryptorchidism and/or micropenis have been described (Lanfranco *et al.*, 2005; Semple *et al.*, 2005; Nimri *et al.*, 2011; Demirbilek *et al.*, 2015). Together, these data show that *KISS1R* plays a key role in the activation of the gonadotrophic axis during early development, and not only at the time of puberty

(Bouvattier et al., 2011). Thus, contrary to some previous reports (Seminara et al., 2003), *KISS1R* would not be specifically involved in pubertal development but would simply have a key role in regulating GnRH secretion at all stages of pre- and post-natal development.

Eight of the patients with biallelic *KISS1R* mutations reported here were aged over 30 years and had received sex-steroid replacement therapy. Our clinical and hormonal monitoring has so far failed to identify any reversible forms. This is in keeping with the literature, as no cases of reversible CHH have been reported in patients with biallelic *KISS1R* mutations (Quinton et al., 1999; Raivio et al., 2007; Sinisi et al., 2008; Laitinen et al., 2012; Sidhoum et al., 2014). Thus, *KISS1R* integrity would be necessary to maintain GnRH secretion during adulthood. However, given the scarcity of reversible forms of CHH, it would be interesting to study a larger population of nCHH patients with biallelic *KISS1R* mutations to ensure that the gonadotrophin deficiency is indeed irreversible.

In conclusion, in the largest series of nCHH patients reported to date, we found that the prevalence of *KISS1R* mutations was only 2.0% (95%CI [0.9–3.1]). We identified 10 new *KISS1R* mutations, which will help to understand the structure–function relationships of this protein. We observed a high prevalence of cryptorchidism and micropenis, supporting the role of *KISS1R* in gonadotropic function during the prenatal period. Among the genes involved in the secretion and action of GnRH tested here, we found that mutations were more frequent in those encoding receptors than in those encoding the corresponding neuropeptides.

Supplementary data

Supplementary data are available at http://humrep.oxfordjournals.org/.

Acknowledgements

We thank Isabelle Boucly, Lénaig Lamour, Chrislaine Saujot for their excellent technical assistance and Say Viengchareun and Marc Lombes for scientific advices. We also thank the European COST Action BM1105 for its support.

Authors' Role

Study design: B.F., A.G.M., J.Y., JB. Execution: B.F., C.P., L.A., A.C., C.B., F.A., D.M., P.C., S.T. SBT, TB. Analysis: B.F., C.P., J.Y., J.B. Manuscript drafting: B.F., J.Y., JB. Critical discussion: C.P., L.A., A.G.M.

References

Ahow M, Min L, Pampillo M, Nash C, Wen J, Soltis K, Carroll RS, Glidewell-Kenney CA, Mellon PL, Bhattacharya M *et al.* KISS1R signals independently of Gαq/11 and triggers LH secretion via the β-arrestin pathway in the male mouse. *Endocrinology* 2014;**155**:4433–4446.

Amazit L, Pasini L, Szafran AT, Berno V, Wu R-C, Mielke M, Jones ED, Mancini MG, Hinojos CA, O'Malley BW *et al.* Regulation of SRC-3 intercompartmental dynamics by estrogen receptor and phosphorylation. *Mol Cell Biol* 2007;**27**:6913–6932.

Beneduzzi D, Trarbach EB, Min L, Jorge AA, Garmes HM, Renk AC, Fichna M, Fichna P, Arantes KA, Costa EMF *et al.* Role of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in patients with a wide spectrum of pubertal delay. *Fertil Steril* 2014;**102**:838–846.e2.

Bhagavath B, Podolsky RH, Ozata M, Bolu E, Bick DP, Kulharya A, Sherins RJ, Layman LC. Clinical and molecular characterization of a large sample of patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril* 2006;**85**:706–713.

Boehm U, Bouloux P-M, Dattani MT, de Roux N, Dodé C, Dunkel L, Dwyer AA, Giacobini P, Hardelin J-P, Juul A *et al.* Expert consensus document: European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism–pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2015;**11**:547–564.

Bouligand J, Ghervan C, Tello JA, Brailly-Tabard S, Salenave S, Chanson P, Lombès M, Millar RP, Guiochon-Mantel A, Young J. Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. *N Engl J Med* 2009;**360**:2742–2748.

Bouvattier C, Maione L, Bouligand J, Dodé C, Guiochon-Mantel A, Young J. Neonatal gonadotropin therapy in male congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol* 2011;**8**:172–182.

Breuer O, Abdulhadi-Atwan M, Zeligson S, Fridman H, Renbaum P, Levy-Lahad E, Zangen DH. A novel severe N-terminal splice site KISS1R gene mutation causes hypogonadotropic hypogonadism but enables a normal development of neonatal external genitalia. *Eur J Endocrinol* 2012;**167**:209–216.

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

Brioude F, Bouligand J, Francou B, Fagart J, Roussel R, Viengchareun S, Combettes L, Brailly-Tabard S, Lombès M, Young J *et al.* Two Families with Normosmic Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism and Biallelic Mutations in KISS1R (KISS1 Receptor): Clinical Evaluation and Molecular Characterization of a Novel Mutation. In Janecke AR, editor. *PLoS One* 2013;**8**:e53896.

Cerrato F, Shagoury J, Kralickova M, Dwyer A, Falardeau J, Ozata M, Van Vliet G, Bouloux P, Hall JE, Hayes FJ *et al.* Coding sequence analysis of GNRHR and GPR54 in patients with congenital and adult-onset forms of hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol* 2006;**155** Suppl:S3–S10.

Chan Y-M, de Guillebon A, Lang-Muritano M, Plummer L, Cerrato F, Tsiaras S, Gaspert A, Lavoie HB, Wu C-H, Crowley WF *et al.* GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:11703–11708.

Chevrier L, de Brevern A, Hernandez E, Leprince J, Vaudry H, Guedj AM, de Roux N. PRR repeats in the intracellular domain of KISS1R are important for its export to cell membrane. *Mol Endocrinol* 2013;**27**:1004–1014.

Demirbilek H, Ozbek MN, Demir K, Kotan LD, Cesur Y, Dogan M, Temiz F, Mengen E, Gurbuz F, Yuksel B *et al.* Normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism due to a novel homozygous nonsense c.C969A (p.Y323X) mutation in the KISS1R gene in three unrelated families. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015;**82**:429–438.

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

de Roux N, Genin E, Carel J-C, Matsuda F, Chaussain J-L, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:10972–10976.

Dungan HM, Gottsch ML, Zeng H, Gragerov A, Bergmann JE, Vassilatis DK, Clifton DK, Steiner RA. The role of kisspeptin-GPR54 signaling in the tonic regulation and surge release of gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone. *J Neurosci* 2007;**27**:12088–12095.

Francou B, Bouligand J, Voican A, Amazit L, Trabado S, Fagart J, Meduri G, Brailly-Tabard S, Chanson P, Lecomte P *et al.* Normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism due to TAC3/TACR3 mutations: characterization of neuroendocrine phenotypes and novel mutations. *PLoS One* 2011;**6**:e25614.

Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ, Gustafson EL. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;**312**:1357–1363.

Gianetti E, Tusset C, Noel SD, Au MG, Dwyer AA, Hughes VA, Abreu AP, Carroll J, Trarbach E, Silveira LFG *et al.* TAC3/TACR3 mutations reveal preferential activation of gonadotropin-releasing hormone release by neurokinin B in neonatal life followed by reversal in adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;**95**:2857–2867.

Gianetti E, Hall JE, Au MG, Kaiser UB, Quinton R, Stewart JA, Metzger DL, Pitteloud N, Mericq V, Merino PM *et al.* When genetic load does not correlate with phenotypic spectrum: lessons from the GnRH receptor (GNRHR). *J Clin Endocrinol Metab* 2012;**97**:E1798–E1807.

Laitinen E-M, Tommiska J, Sane T, Vaaralahti K, Toppari J, Raivio T. Reversible congenital hypogonadotropic hypogonadism in patients with CHD7, FGFR1 or GNRHR mutations. *PLoS One* 2012;**7**:e39450.

Lanfranco F, Gromoll J, von Eckardstein S, Herding EM, Nieschlag E, Simoni M. Role of sequence variations of the GnRH receptor and G protein-coupled receptor 54 gene in male idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol* 2005;**153**:845–852.

Layman LC, Cohen DP, Jin M, Xie J, Li Z, Reindollar RH, Bolbolan S, Bick DP, Sherins RR, Duck LW *et al.* Mutations in gonadotropin-releasing hormone receptor gene cause hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Genet* 1998; **18**:14–15.

Maione L, Albarel F, Bouchard P, Gallant M, Flanagan CA, Bobe R, Cohen-Tannoudji J, Pivonello R, Colao A, Brue T *et al.* R31C GNRH1 mutation and congenital hypogonadotropic hypogonadism. *PLoS One* 2013;**8**:e69616.

Min L, Nie M, Zhang A, Wen J, Noel SD, Lee V, Carroll RS, Kaiser UB. Computational analysis of missense variants of G protein-coupled receptors involved in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Neuroendocrinology* 2015.

Q3

Miraoui H, Dwyer AA, Sykiotis GP, Plummer L, Chung W, Feng B, Beenken A, Clarke J, Pers TH, Dworzynski P *et al.* Mutations in FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, and FLRT3 are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Am J Hum Genet* 2013;**92**:725–743.

Nimri R, Lebenthal Y, Lazar L, Chevrier L, Phillip M, Bar M, Hernandez-Mora E, de Roux N, Gat-Yablonski G. A novel loss-of-function mutation in GPR54/KISS1R leads to hypogonadotropic hypogonadism in a highly consanguineous family. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;**96**:E536–E545.

Pallais JC, Bo-Abbas Y, Pitteloud N, Crowley WF, Seminara SB. Neuroendocrine, gonadal, placental, and obstetric phenotypes in patients with IHH and mutations in the G-protein coupled receptor, GPR54. *Mol Cell Endocrinol* 2006;**254–255**:70–77.

Pampillo M, Camuso N, Taylor JE, Szereszewski JM, Ahow MR, Zajac M, Millar RP, Bhattacharya M, Babwah AV. Regulation of GPR54 signaling by GRK2 and {beta}-arrestin. *Mol Endocrinol* 2009;**23**:2060–2074.

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

Raivio T, Falardeau J, Dwyer A, Quinton R, Hayes FJ, Hughes VA, Cole LW, Pearce SH, Lee H, Boepple P *et al.* Reversal of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med* 2007;**357**:863–873.

Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG *et al.* The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003; **349**:1614–1627.

Semple RK, Achermann JC, Ellery J, Farooqi IS, Karet FE, Stanhope RG, O'Rahilly S, Aparicio SA. Two novel missense mutations in G protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;**90**:1849–1855.

Sidhoum VF, Chan Y-M, Lippincott MF, Balasubramanian R, Quinton R, Plummer L, Dwyer A, Pitteloud N, Hayes FJ, Hall JE *et al.* Reversal and relapse of hypogonadotropic hypogonadism: resilience and fragility of the reproductive neuroendocrine system. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; **99**:861–870.

Sinisi AA, Asci R, Bellastella G, Maione L, Esposito D, Elefante A, De Bellis A, Bellastella A, Iolascon A. Homozygous mutation in the prokineticin-receptor2 gene (Val274Asp) presenting as reversible Kallmann syndrome and persistent oligozoospermia: case report. *Hum Reprod* 2008;**23**:2380–2384.

Sykiotis GP, Plummer L, Hughes VA, Au M, Durrani S, Nayak-Young S, Dwyer AA, Quinton R, Hall JE, Gusella JF *et al.* Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;**107**:15140–15144.

Teles MG, Trarbach EB, Noel SD, Guerra G, Jorge A, Beneduzzi D, Bianco SD, Mukherjee A, Baptista MT, Costa EM *et al.* A novel homozygous splice acceptor site mutation of KISS1R in two siblings with normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol* 2010;**163**:29–34.

Tello JA, Newton CL, Bouligand J, Guiochon-Mantel A, Millar RP, Young J. Congenital hypogonadotropic hypogonadism due to GnRH receptor mutations in three brothers reveal sites affecting conformation and coupling. *PLoS One* 2012;**7**:e38456.

Tenenbaum-Rakover Y, Commenges-Ducos M, Iovane A, Aumas C, Admoni O, de Roux N. Neuroendocrine phenotype analysis in five patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism due to a L102P inactivating mutation of GPR54. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; **92**:1137–1144.

Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JR, Ozbek MN *et al.* TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 2009; **41**:354–358.

Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz MB, Erdogan S, Gurbuz F, Temiz F, Millar RP, Yuksel B. Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med* 2012;**366**:629–635.

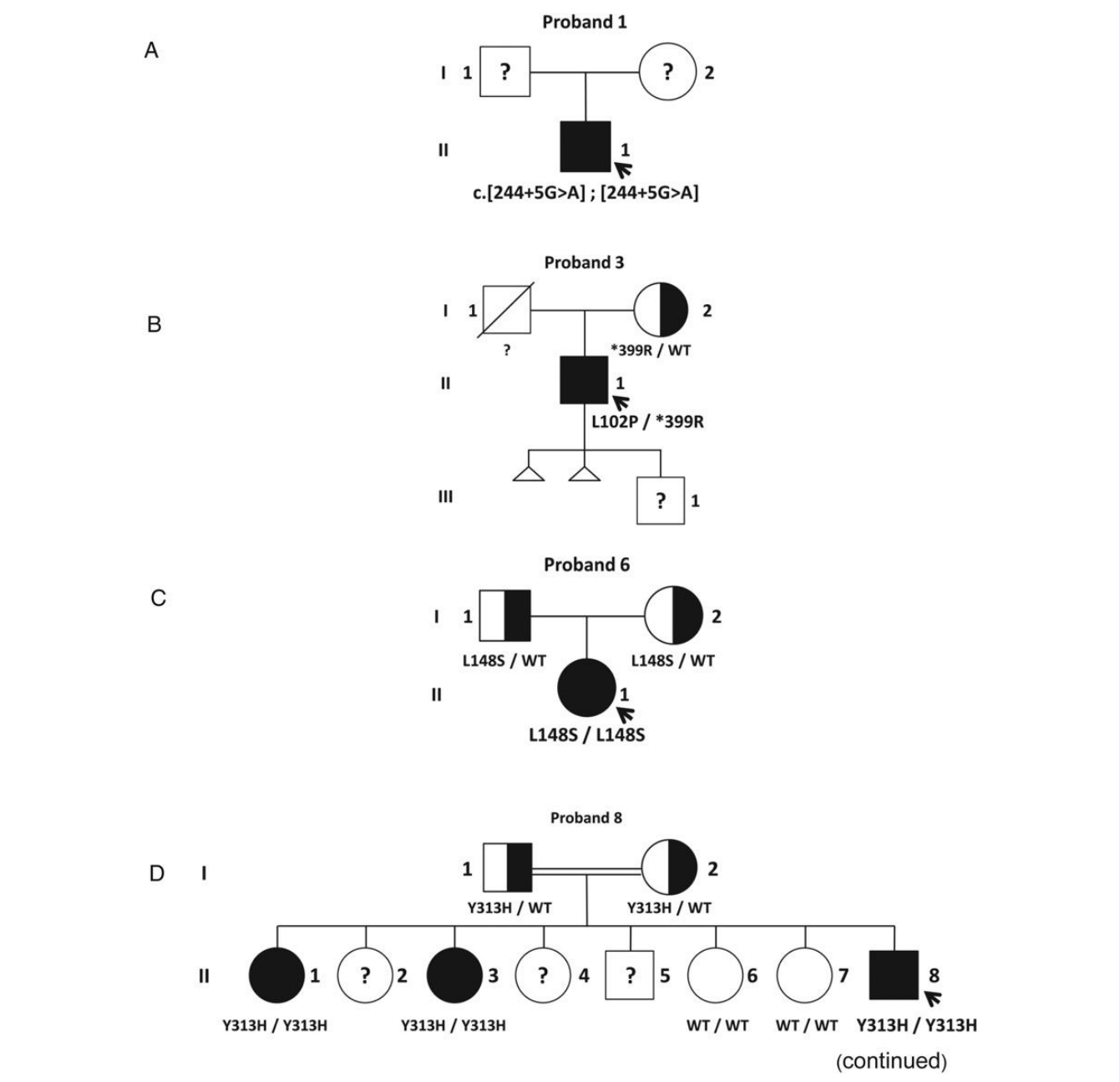
Tusset C, Noel SD, Trarbach EB, Silveira LFG, Jorge AAL, Brito VN, Cukier P, Seminara SB, de Mendonça BB, Kaiser UB *et al.* Mutational analysis of TAC3 and TACR3 genes in patients with idiopathic central pubertal disorders. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2012;**56**:646–652.

Xu H, Niu Y, Wang T, Liu S, Xu H, Wang S, Liu J, Ye Z. Novel FGFR1 and KISS1R mutations in Chinese Kallmann syndrome males with Cleft Lip/Palate. *Biomed Res Int* 2015;**2015**:649698.

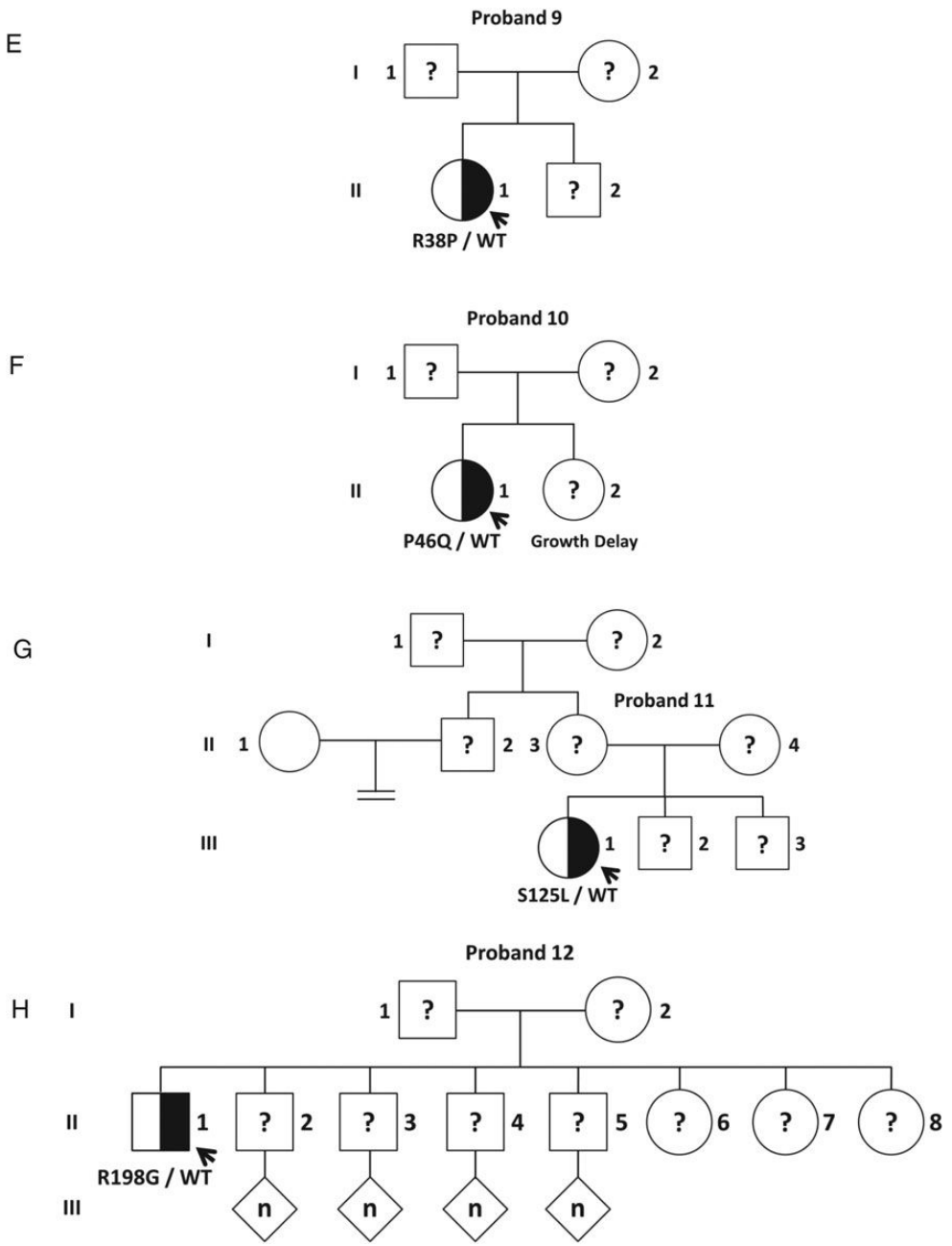
Young J. Approach to the male patient with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;**97**:707–718.

Young J, Bouligand J, Francou B, Raffin-Sanson M-LL, Gaillez S, Jeanpierre M, Grynberg M, Kamenicky P, Chanson P, Brailly-Tabard S *et al.* TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;**95**:2287–2295.

Human Reproduction, Vol.0, No.0 pp. 1–9, 2016
Advanced Access publication on Month 00, 0000 doi:10.1093/humrep/dew073



Supplementary Figure S1 Family pedigrees with corresponding *KISS1R* mutations. Solid symbols indicate affected subjects and half-shaded symbols indicate unaffected heterozygotes. Circles represent female family members and squares denote male family members. Small triangles indicate miscarriages. (**A**) The proband, subject II-1 (see also Table II, proband 1), was homozygous for a splice mutation in intron 1. (**B**) The proband, subject II-1 (see also Table II, proband 3), was compound heterozygote for the *KISS1R* mutations L102P and *399R. The unaffected mother (I-2) was heterozygous for the *399R. The unaffected father was deceased and therefore unavailable for genetic analysis. The L102P substitution affects an amino acid in the second transmembrane domain. The *399R substitution abolishes the natural stop codon. (**C**) The proband, subject II-1 (see also Table II, proband 6), was homozygous for the L148S mutation. The L148S substitution affects a well-conserved amino acid in the first intracellular loop. (**D**) The proband, subject II-8 (see also Table II, proband 8), and his two affected sisters, subjects II-1 and II-3, were homozygous for the Y313H mutation. The unaffected father (I-1) and mother (I-2) were heterozygous for the same mutation. Two unaffected sisters, II-6 and II-7, carried two wild-type alleles. The Y313H substitution affects an amino acid in the seventh transmembrane domain. (**E**) The proband, subject II-1 (Table II, proband 9), was heterozygous for R38P substitution a weakly conserved amino acid in N-terminal domain. (**F**) The proband, subject II-1 (Table II, proband 10), was heterozygous for P46Q substitution an highly conserved amino acid located in N-terminal/first transmembrane domain junction. She presents an hypogonadotropic hypogonadism and a pituitary stalk interruption. Her younger sister presents a growth delay. (**G**) The proband, subject III-1 (Table II, proband 11), was heterozygous for S125L substitution an highly conserved amino acid located in the third transmembrane domain. (H) The proband, subject II-1 (Table II, proband 12), was heterozygous for R198G substitution an moderately conserved amino acid located in the second extracellular loop.



Supplementary Figure S1 *Continued.*

Supplementary Table SI **Normosmic CHH Patients bearing rare variants of GNRHR, GNRH1, TAC3, TACR3 and KISS1 genes.**

Gene	Protein	cDNA	Functional	Classification: mutation, variant of unknown signification (VOUS), polymorphism	Already reported in (see ref. in main text)	EXAC (%)	Bioinformatic Prediction
Genotypes in patients with biallelic variants							
GNRHR	p.[Asn10_Gln11delinsLysLys]; [Asn10_Gln11delinsLysLys]	c.[30_31delinsAA]; [30_31delinsAA]	Decrease Binding and IP3 Signaling	Mutation + Mutation	a	Absent	–
GNRHR	p.[Ile37Ser];[Gln106Arg]	c.[110T>G];[317A>G]		Mutation + Mutation	Novel Ile37Ser	Ile37Ser Absent	S: deleterious (score 0) PP2: PROBABLY DAMAGING with a score of 0.999 (sensitivity 0.14; specificity 0.99)
GNRHR	p.[Val94Ala];[Gln106Arg]	c.[281T>C];[317A>G]		Mutation + Mutation	Novel Val94Ala	Val94Ala ALL: C = 0.01% – NFE: 0.02%	S: tolerated (score 0.17) PP2: PROBABLY DAMAGING with a score of 0.999 (sensitivity 0.14; specificity 0.99)
GNRHR	p.[Gln106Arg];[Gln106Arg]	c.[317A>G];[317A>G]	Decrease Binding and IP3 Signaling	Mutation + Mutation	de Roux *et al.*, 1997	ALL:G = 0.25% – NFE:0.40%	S: Deleterious (score 0) PP2: PROBABLY DAMAGING with a score of 0.997 (sensitivity 0.41; specificity 0.98)
GNRHR	p.[Gln106Arg];[Arg139His]	c.[317A>G];[417G>A]		Mutation + Mutation			
GNRHR	p.[Gln106Arg];[Arg139His]	c.[317A>G];[417G>A]		Mutation + Mutation			
GNRHR	p.[Gln106Arg];[Arg262Gln]	c.[317A>G];[785G>A]		Mutation + Mutation			
GNRHR	p.[Gln106Arg];[Arg262Gln]	c.[317A>G];[785G>A]		Mutation + Mutation			
GNRHR	p.[Gln106Arg];[Arg262Gln]	c.[317A>G];[785G>A]		Mutation + Mutation			
GNRHR	p.[Ala129Asn];[Ala129Asn]	c.[386C>A];[386C>A]	Decrease Binding and IP3 Signaling	Mutation + Mutation	b	ALL:A = 0.00% – NFE:0.00%	S: deleterious (score 0.02) PP2: PROBABLY DAMAGING with a score of 1.000 (sensitivity 0.00; specificity 1.00)

Continued

Supplementary Table SI *Continued.*

Gene	Protein	cDNA	Functional	Classification: mutation, variant of unknown signification (VOUS), polymorphism	Already reported in (see ref. in main text)	EXAC (%)	Bioinformatic Prediction
GNRHR	p.[Arg139His];[Arg139His]	c.[416G>A];[416G>A]	Decrease IP3 Signaling	Mutation + Mutation	a	ALL:A = 0.02% – NFE:0.02%	S: deleterious (score 0) PP2: PROBABLY DAMAGING with a score of 1.000 (sensitivity 0.00; specificity 1.00)
GNRHR	p.[Arg139His];[Arg262Gln]	c.[417G>A];[785G>A]		Mutation + Mutation			
GNRHR	p.[Ala171Thr];[Arg262Gln]	c.[511G>A];[785G>A]	Decrease IP3 Signaling	Mutation + Mutation	c	ALL:A = 0.00% – NFE:0.00%	S: deleterious (score 0.03) PP2: POSSIBLY DAMAGING with a score of 0.955 (sensitivity 0.79; specificity 0.95)
GNRHR	p.[Arg262Gln];[Arg262Gln]	c.[785G>A];[785G>A]	Decrease IP3 Signaling	Mutation + Mutation	de Roux *et al.*, 1997	ALL:A = 0.20% – NFE:0.24%	S: deleterious (score 0.04) PP2: PROBABLY DAMAGING with a score of 1.000 (sensitivity 0.00; specificity: 1.00)
GNRHR	p.[Arg262Gln];[Arg262Gln]	c.[785G>A];[785G>A]		Mutation + Mutation			
GNRHR	p.[Thr269Met];[Thr269Met]	c.[806C>T];[806C>T]		Mutation + Mutation	Gianetti *et al.*, 2012	ALL:T = 0.00% – AFR:0.00%	S: deleterious (score 0) PP2: PROBABLY DAMAGING with a score of 1.000 (sensitivity 0.00; specificity 1.00)
GNRHR	p.[Tyr290Phe];[Tyr290Phe]	c.[869A>T];[869A>T]	Decrease Binding	Mutation + Mutation	d	Absent	S: tolerated (score 0.59) PP2: PROBABLY DAMAGING with a score of 1.000 (sensitivity 0.00; specificity 1.00)
GNRH1	p.[Leu7Thrfs*37];[Leu7Thrfs*37]	c.[18dup];[18dup]		Mutation + Mutation	Bouligand *et al.*, 2009		
TACR3	p.[Phe78Leu];[Trp275*]	c.[232T>C];[824 G>A]		Mutation + Mutation	Novel Phe78Leu	ALL:C = 0.00% – NFE:0.00%	S: deleterious (score 0.04) PP2: PROBABLY DAMAGING with a score of 1.000 (sensitivity 0.00; specificity 1.00)

TACR3	p.[Gln161Hisfs*23];[Gln161Hisfs*23]	c.[483_499del];[483_499del]		Mutation + Mutation	Francou *et al.*, 2011			–
TACR3	p.[?];[?]	c.[738−1G>A];[738-1G>A]	Splice Site Altered	Mutation + Mutation	Young *et al.*, 2010			Splice Site Altered
TACR3	p.[Tyr267Asn];[Trp275*]	c.[799 T>C];[824 G>A]	decrease MAPK activity	Mutation + Mutation	Francou *et al.*, 2011			–
TACR3	p.[Trp275*];[Gln335*]	c.[824 G>A];[1003 C>T]	–	Mutation + Mutation	Francou *et al.*, 2011			–
TACR3	p.[Trp275*];[Trp275*]	c.[824G>A];[824G>A]	–	Mutation + Mutation				–
TAC3	p.[Gln66*];[?]	c.[196 C>T];[238+2dup]		Mutation + Mutation	e	ALL:T = 0.00% – AFR:0.03%		Splice site altered
TAC3	p.[?];[?]	c.[209-1G>C];[209-1G>C]	Splice Site Altered	Mutation + Mutation	Young *et al.*, 2010			Splice site altered
Genotypes in patients with monoallelic variants								
GNRHR	p.[?];[=]	c.[-8G>A];[=]		VOUS	Novel	ALL:A = 0.04% – NFE:0.06%		
GNRHR	p.[?];[=]	c.[-8G>A];[=]		VOUS		ALL:A = 0.04% – NFE:0.06%		
GNRHR	p.[?];[=]	c.[-8G>A];[=]		VOUS		ALL:A = 0.04% – NFE:0.06%		
GNRHR	p.[Val39Serfs*15];[=]	c.[113dup];[=]		Mutation		Absent		
GNRHR	p.[Gln106Arg];[=]	c.[317 A>G];[=]		Mutation		ALL:G = 0.25% – NFE:0.40%		S : Deleterious (score: 0) PP2 : PROBABLY DAMAGING with a score of 0.997 (sensitivity: 0.41; specificity: 0.98)
GNRHR	p.[Gln106Arg];[=]	c.[317A>G];[=]		Mutation		ALL:G = 0.25% – NFE:0.40%		S: deleterious (score 0) PP2: PROBABLY DAMAGING with a score of 0.997 (sensitivity 0.41; specificity 0.98)
GNRHR	p.[Gln106Arg];[=]	c.[317A>G];[=]		Mutation		ALL:G = 0.25% – NFE:0.40%		S: deleterious (score 0) PP2: PROBABLY DAMAGING with a score of 0.997 (sensitivity 0.41; specificity 0.98)
GNRHR	p.[Gln106Arg];[=]	c.[317A>G];[=]		Mutation		ALL:G = 0.25% – NFE:0.40%		S: deleterious (score 0) PP2: PROBABLY DAMAGING with a score of 0.997 (sensitivity 0.41; specificity 0.98)

Continued

Supplementary Table SI *Continued.*

Gene	Protein	cDNA	Functional	Classification: mutation, variant of unknown signification (VOUS), polymorphism	Already reported in (see ref. in main text)	EXAC (%)	Bioinformatic Prediction
GNRHR	p.[Gln106Arg];[=]	c.[317A>G];[=]		Mutation		ALL:G = 0.25% – NFE:0.40%	S: deleterious (score 0) PP2: PROBABLY DAMAGING with a score of 0.997 (sensitivity 0.41; specificity 0.98)
GNRHR	p.[Leu266Arg];[=]	c.[797 T>G];[=]	Decrease Binding and IP3 Signaling	Mutation	f	ALL:G = 0.00% – NFE:0.00%	S: deleterious (score 0) PROBABLY DAMAGING with a score of 1.000 (sensitivity 0.00; specificity 1.00)
GNRH1	p.[Thr15Ile];[=]	c.[44C>T];[=]		VOUS	Novel	Absent	S: tolerated (score 0.64, median 3.39) PP2: BENIGN with a score of 0.012 (sensitivity 0.96; specificity 0.78)
GNRH1	p.[Trp26*];[=]	c.[77G>A];[=]	–	Mutation	Novel	Absent	
GNRH1	p.[Arg31Cys];[=]	c.[91C>T];[=]	Decrease binding and transduction activities	Mutation	Maione *et al.*, 2013	Absent	S: deleterious (score 0) PP2: PROBABLY DAMAGING with a score of 1.000 (sensitivity 0.00; specificity 1.00)
GNRH1	p.[Arg31Cys];[=]	c.[91C>T];[=]	Decrease binding and transduction activities	Mutation	Maione *et al.*, 2013	Absent	S: deleterious (score 0) PP2: PROBABLY DAMAGING with a score of 1.000 (sensitivity 0.00; specificity 1.00)
GNRH1	p.[Glu80Gln];[=]	c.[238G>C];[=]		VOUS AFR:1.88%	Novel	ALL:C = 0.16% – AFR:1.88%	Splice Site Altered
GNRH1	p.[?];[=]	c.[*17G>A];[=]		VOUS	Novel	ALL:A = 0.00% – NFE:0.00%	
TACR3	p.[Arg230His];[=]	c.[689G>A];[=]	No changes versus WT in MAPK activities	VOUS	Francou *et al.*, 2011	ALL:A = 0.00% – NFE:0.00%	S: deleterious (score 0) PP2: PROBABLY DAMAGING with a score of 1.000 (sensitivity 0.00; specificity 1.00)

TACR3	p.[His248Arg];[=]	c.[743A>G];[=]		VOUS	Novel	Absent	S: Deleterious (score 0.03) PP2: PROBABLY DAMAGING with a score of 0.986 (sensitivity 0.74; specificity 0.96)
TACR3	p.(=)	c.[804C>A];[=]		VOUS	Novel	Absent	
TACR3	p.(=)	c.[804C>A];[=]		VOUS	Novel	Absent	
TACR3	p.(=)	c.[804C>A];[=]		VOUS	Novel	Absent	
TACR3	p.(=)	c.[804C>A];[=]		VOUS	Novel	Absent	
TACR3	p.[Lys286Arg];[Met306Ile]	c.[857A>G;918G>A];[=]	No changes versus WT in MAPK activities	Polymorphism	Francou *et al.*, 2011	ALL:G = 0.37% - AFR:2.44% + ALL:A = 0.01% – AFR:0.00%	S: tolerated (score 0.46) PP2: BENIGN with a score of 0.001 (sensitivity 0.99; specificity 0.15) + S Tolerated (score 0.44) PP2: BENIGN with a score of 0.000 (sensitivity: 1.00; specificity: 0.00)
TACR3	p.[Arg372His];[=]	c.[1115 G>A];[=]		VOUS	Novel	ALL:A = 0.00% – AFR:0.02%	S: Tolerated (score 0.18) PP2: BENIGN with a score of 0.090 (sensitivity 0.93; specificity 0.85)
TAC3	p.[Arg80Cys];[=]	c.[238 C>T];[=]		VOUS	Novel	Absent	S: deleterious (score 0) PP2: PROBABLY DAMAGING with a score of 1.000 (sensitivity 0.00; specificity 1.00)
TAC3	p.[?];[=]	c.[238+1G>T];[=]		VOUS	Novel	Absent	Splice Site Altered
Genotype in a Patient with Oligogenic Variants							
GNRHR/ TACR3	GNRHR:p.[Ile37Ser];[Leu266Arg] TACR3:p.[?];[=]	GNRHR:c.[110T>G];[797T>G] TACR3:c.[-20G>A];[=]	2 mutations GNRHR + 1 VOUS TACR3 AFR:1.39%	ALL:A = 0.12% - AFR:1.39%			
Reference Supplementary data, table SI			VOUS :			ExAC	Prediction for missense
a	Costa JCEM 2001;86(6):2680–2686		Variant of unknow signification			AFR: African	S: SIFT
b	Caron JCEM 1999;84(3):990–996					EAS: East Asian	PP2 : Polyphen2

Continued

Supplementary Table SI *Continued.*

Gene	Protein	cDNA	Functional	Classification: mutation, variant of unknown signification (VOUS), polymorphism	Already reported in (see ref. in main text)	EXAC (%)	Bioinformatic Prediction
c	Karges JCEM 2003;88(4):1873–1879		Ms Ref () : See reference in main manuscript.			SAS : South Asian	
d	Coetsee Biochemistry 2008;47(39):10305–10313					NFE : European (non-Finnish)	
e	Xin JPEM 2015;28(1–2):65–71					FIN: European (Finnish)	
f	Bedecarrats Mol Cell Endocrinol 2003;205(1–2):51–64					OTH: Others	
						AMR: Latino	

Supplementary Table SII **Frequent variants of KISS1R, KISS1, GNRHR, GNRH1, TACR3 and TAC3 genes found in nCHH patients.**

Gene	Mutation	Protein	Allele count	Allele Number	Number of homozygotes	Number of heterozygotes	Allele Frequency	Exac
KISS1R	c.24A>G	p.(=)	263	1206	56	151	0,22	ExAC: ALL:G = 25.91% - AFR:27.88% - AMR:29.49% - EAS:12.50% - SAS:26.41% - NFE:25.19% - FIN:37.50% - OTH:20.73%
KISS1R	c.1091T>A	p.Leu364His	858	1206	336	186	0,71	ExAC: ALL:A = 78.27% - AFR:94.29% - AMR:91.67% - EAS:87.88% - SAS:76.07% - NFE:77.15% - FIN:76.83% - OTH:92.86%
KISS1	c.268C>G	p.His90Asp	3	550	0	3	0,01	ExAC: ALL:G = 0.24% - AFR:3.55% - AMR:0.21% - EAS:0.00% - SAS:0.00% - NFE:0.00% - FIN:0.00% - OTH:0.00%
KISS1	c.328 C>A	p.Pro110Thr	1	550	0	1	0,00	ExAC: ALL:A = 0.63% - AFR:0.09% - AMR:0.03% - EAS:6.62% - SAS:0.43% - NFE:0.02% - FIN:0.00% - OTH:0.22%
KISS1	c.58G>A	p.Glu20Lys	16	550	1	14	0,03	ExAC: ALL:A = 4.89% - AFR:0.76% - AMR:3.58% - EAS:4.69% - SAS:4.26% - NFE:5.79% - FIN:9.46% - OTH:5.78%
KISS1	c.107A>G	p.Gln36Arg	25	550	8	9	0,05	ExAC: ALL:G = 5.44% - AFR:22.26% - AMR:3.36% - EAS:0.04% - SAS:3.53% - NFE:5.02% - FIN:5.11% - OTH:5.26%
KISS1	c.242C>G	p.Pro81Arg	167	550	41	85	0,30	ExAC: ALL:G = 34.13% - AFR:42.04% - AMR:45.27% - EAS:47.17% - SAS:26.67% - NFE:32.54% - FIN:31.18% - OTH:31.21%
GNRHR	c.453C>T	p.(=)	96	1080	5	86	0,09	ExAC: ALL:T = 7.59% - AFR:10.60% - AMR:8.84% - EAS:0.58% - SAS:5.34% - NFE:8.89% - FIN:2.72% - OTH:5.11%
GNRH1	c.47G>C	p.Trp16Ser	231	852	38	155	0,27	ExAC: ALL:C = 23.32% - AFR:8.88% - AMR:13.44% - EAS:54.75% - SAS:12.37% - NFE:25.29% - FIN:28.74% - OTH:22.22%
TACR3	c.857C>G	p.Lys286Arg	9	702	1	7	0,01	ExAC: ALL:G = 0.37% - AFR:2.44% - AMR:0.37% - EAS:0.49% - SAS:0.04% - NFE:0.15% - FIN:0.00% - OTH:0.66%
TACR3	c.1085+16C>T	p.?	2	702	0	2	0,00	ExAC: ALL:T = 1.10% - AFR:11.80% - AMR:0.48% - EAS:0.00% - SAS:0.09% - NFE:0.04% - FIN:0.00% - OTH:0.44%
TAC3	c.295T>C	p.Ser99Pro	5	702	0	5	0,01	ExAC: ALL:C = 0.75% - AFR:8.15% - AMR:0.41% - EAS:0.00% - SAS:0.01% - NFE:0.02% - FIN:0.00% - OTH:0.44%

ExAC AFR, African; EAS, East Asian; SAS, South Asian; NFE, European (non-Finnish); FIN, European (Finnish); OTH, others; AMR, Latino.

Conclusion de l'article *Francou et al. Hum Reprod. 2016*

Prévalence des mutations *KISS1R* dans une grande série de patients nCHH.

La fréquence des mutations *KISS1R* retrouvée ici était relativement faible (2 %) bien que supérieure à celle rapportée par Sykiotis et al. [131]. Ces données indiquent de façon concordante que le gène *KISS1R* ne contribue que de façon minoritaire au phénotype nCHH. De fait, à ce jour seules 19 mutations différentes perte de fonction de *KISS1R* ont été décrites depuis la découverte de l'implication de ce récepteur dans le contrôle neuroendocrine de la sécrétion de GnRH [35,53–55,71,157–165]. Nous rapportons ici 10 nouvelles mutations de ce gène ce qui va permettre aussi de mieux cerner les relations structure / fonction du récepteur à sept domaines transmembranaires des kisspeptines.

Dans notre série de patients, nous avons observé que le gène muté le plus fréquemment retrouvé était *GNRHR* codant le récepteur de la GnRH, suivi de *KISS1R* et de *TACR3* codant le récepteur de la Neurokinine B. Ces résultats sont en accord avec les études précédentes. *GNRHR* est donc le gène à analyser en première intention chez un patient avec nCHH.

Les mutations des gènes codant les ligands de ces récepteurs sont plus rares. Ceci n'est pas forcément surprenant du fait de la taille relative de ces gènes. Ainsi, malgré cette étude extensive nous n'avons pas identifié de mutation *KISS1* (1 seule mutation publiée en 2012 par Topaloglu et al.[65]).

De façon intéressante d'un point de vue physiopathologique, plusieurs patients décrits ici porteurs de mutations biallèliques de *KISS1R* présentaient un micropénis (4/5) plus ou moins associé à une cryptorchidie (2/4). Ces signes cliniques indiquent l'existence d'un déficit gonadotrope qui existait depuis la vie fœtale et néonatale [20]. *KISS1R* joue donc un rôle essentiel dans l'activation de l'axe gonadotrope à des stades précoces du développement et pas seulement à partir de l'âge pubertaire. En d'autres termes *KISS1R* n'est pas un gène spécifique du développement pubertaire

comme cela a été annoncé par certains [54] mais un acteur essentiel de la régulation de la sécrétion de GnRH à tous les stades du développement pré- et post natal.

Parmi les malades avec mutations *KISS1R* à l'état biallèlique rapportés dans notre série (8 cas index et les 2 apparentés), six sont âgés de plus de 30 ans et ont reçu des traitements substitutifs par des stéroïdes sexuels. À ce jour, l'évaluation clinique et hormonale répétée n'a pas permis d'identifier de formes réversibles. Ceci est en accord avec les données de la littérature [114,166–169]. Ces données suggèrent que l'intégrité du récepteur KISS1R est nécessaire au maintien de la sécrétion de GnRH à l'âge adulte. Cependant étant donné la rareté des formes réversibles de CHH il faudrait évaluer une population plus importante de sujets nCHH avec mutations biallèliques de *KISS1R* pour s'assurer de l'absence de formes réversibles.

En conclusion, nous montrons ici que les mutations *KISS1R* ne sont responsables du phénotype nCHH que chez une petite minorité de patients (2 %). L'ensemble des gènes impliqués dans la sécrétion et l'action de la GnRH analysés ici ne sont impliqués dans le nCHH que chez moins de 15 % des patients, ce qui indique que d'autres gènes sont impliqués dans le phénotype nCHH. L'existence de cryptorchidie et / ou micropénis chez la majorité des hommes avec mutations biallèliques *KISS1R* suggère fortement que ce gène est essentiel à la sécrétion prénatale de la GnRH.

nCHH par mutations de *TAC3* et *TACR3*

Article *Young et al. Clin Endocrinol Metab. 2010*

J Clin Endocrin Metab. First published ahead of print March 1, 2010 as doi:10.1210/jc.2009-2600

ORIGINAL ARTICLE

Endocrine Research

TAC3 and *TACR3* Defects Cause Hypothalamic Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism in Humans

Jacques Young, Jérôme Bouligand, Bruno Francou, Marie-Laure Raffin-Sanson, Stéphanie Gaillez, Marc Jeanpierre, Michael Grynberg, Peter Kamenicky, Philippe Chanson, Sylvie Brailly-Tabard, and Anne Guiochon-Mantel

Introduction de l'article *Young et al. J Clin Endocrinol Metab. 2010*

Les mutations *TAC3* et *TACR3* sont une cause hypothalamique de nCHH.

Depuis la découverte de l'implication de *KISS1R* en 2003 dans les CHH, aucun autre gène de régulation de la signalisation de la GnRH n'a été découvert jusqu'en 2009 [73]. Topaloglu et al. identifient cette année-là des mutations de deux gènes *TAC3* et *TACR3* provoquant l'apparition de CHH chez l'homme. Ces gènes codent respectivement un décapeptide, la Neurokinine B, et son récepteur à sept domaines transmembranaires NK3R.

De la même façon que pour *KISS1R,* cette découverte a été permise par l'étude des régions d'homozygotie dans neuf familles consanguines avec plusieurs cas de CHH. De la même façon que pour *KISS1R*, le rôle de cette voie de signalisation n'avait pas été relié à la reproduction mais au comportement chez le rongeur [170,171] (amélioration de la mémoire, propriétés anxiolytiques et neuroprotectrices).

Avant la publication de notre travail seulement quatre mutations *TACR3* et une mutation *TAC3* étaient connues, toutes décrites à l'état homozygote par l'équipe de Topaloglu dans les populations turque et kurde [74]. Il s'agissait de déterminer la prévalence des mutations de ces gènes chez les patients CHH dans notre cohorte issue de la population Française. De plus, l'action de la Neurokinine B et de son récepteur sur le contrôle de la puberté restait inconnue : s'agit-il d'une action hypothalamique sur la sécrétion de la GnRH ou d'une action directe sur l'hypophyse et la sécrétion des gonadotrophines ?

Notre travail rapporte la description de quatre *propositus* atteints de nCHH par mutations *TAC3* et *TACR3*. La pathogénicité des mutations est démontrée par des études fonctionnelles. Pour la première fois chez des patients mutés pour ces gènes, nous décrivons les profils de base de sécrétion des gonadotrophines et les profils après stimulation par la GnRH (administré de façon pulsatile). Ceci permet de différencier si l'altération de la voie de signalisation de la Neurokinine B intervient au niveau hypothalamique ou hypophysaire.

J Clin Endocrin Metab. First published ahead of print March 1, 2010 as doi:10.1210/jc.2009-2600

TAC3 and *TACR3* Defects Cause Hypothalamic Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism in Humans

Jacques Young, Jérôme Bouligand, Bruno Francou, Marie-Laure Raffin-Sanson, Stéphanie Gaillez, Marc Jeanpierre, Michael Grynberg, Peter Kamenicky, Philippe Chanson, Sylvie Brailly-Tabard, and Anne Guiochon-Mantel

Faculté de Médecine Paris-Sud (J.Y., J.B., B.F., M.G., P.K., P.C., S.B.-T., A.G.-M.), University Paris-Sud, INSERM Unité Mixte de Recherche S693, Le Kremlin Bicêtre, F-94276, France; Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction and Centre de Référence des Maladies Endocriniennes Rares de la Croissance (J.Y., P.K., P.C.) and Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique, et Hormonologie (J.B., B.F., S.B.-T., A.G.-M), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 693 (J.Y., J.B., B.F., P.K., P.C., S.B.-T., A.G.-M.), IFR93, Le Kremlin-Bicêtre, F-94275, France; Service d'Endocrinologie (M.-L.R.-S.), Hôpital Ambroise Paré, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris F-92100 Boulogne-Billancourt, France; Faculté de médecine Paris-Ile de France Ouest, Université de Versailles Saint Quentin (M.L.-R.S.), Centre de Génétique Humaine (S.G.), Liège, Belgique; and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 567 (M.-L. R.-S., M.J.), Université Paris Descartes, F-75014 Paris, France

Context: Missense loss-of-function mutations in *TAC3* and *TACR3*, the genes encoding neurokinin B and its receptor NK3R, respectively, were recently discovered in kindreds with nonsyndromic normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism (CHH), thus identifying a fundamental role of this pathway in the human gonadotrope axis.

Objective: The objective of the study was to investigate the consequences on gonadotrope axis of *TAC3* deletion and *TACR3* truncation in adult patients with normosmic complete CHH.

Results: We identified three unrelated patients with the same homozygous substitution in the *TAC3* intron 3 acceptor splicing site (c.209-1G>C) and three siblings who bore a homozygous mutation in the *TACR3* intron 2 acceptor splicing site (c.738-1G>A). We demonstrated that these two mutations, respectively, deleted neurokinin B and truncated its receptor NK3R. We found in three patients with *TAC3* mutation originating from Congo and Haiti a founding event in a more distant ancestor by means of haplotype analysis. We calculated that time to this common ancestor was approximately 21 generations. In several patients we observed a dissociation between the very low LH and normal or nearly normal FSH levels, this gonadotropin responding excessively to the GnRH challenge test. This particular hormonal profile, suggests the possibility of a specific neuroendocrine impairment in patients with alteration of neurokinin B signaling. Finally, in these patients, pulsatile GnRH administration normalized circulating sex steroids, LH release, and restored fertility in one subject.

Conclusion: Our data demonstrate the hypothalamic origin of the gonadotropin deficiency in these genetic forms of normosmic CHH. Neurokinin B and NK3R therefore both play a crucial role in hypothalamic GnRH release in humans. **(*J Clin Endocrinol Metab* 95: 0000–0000, 2010)**

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in U.S.A.
Copyright © 2010 by The Endocrine Society
doi: 10.1210/jc.2009-2600 Received December 7, 2009. Accepted January 26, 2010.

Abbreviations: CHH, Congenital hypogonadotropic hypogonadism; MRI, magnetic resonance imaging; NKB, neurokinin B; NK3R, NKB receptor.

Copyright (C) 2010 by The Endocrine Society

Missense loss-of-function mutations in *TAC3* and *TACR3*, the genes encoding neurokinin B (NKB) and its receptor NK3R, respectively, were recently discovered in consanguineous kindreds of Turkish origin with nonsyndromic normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism (CHH), thus identifying a fundamental role of this pathway in the human gonadotrope axis (1). How exactly NKB and NK3R exert their effects on central neuroendocrine control of puberty and reproduction in humans is unclear (2). One possibility is an action on hypothalamic GnRH release (3) because NK3R is expressed by rodent GnRH-expressing neurons, and tachykinin peptide is strongly expressed by hypothalamic neurons that also express kisspeptin 1 (4, 5), a neuropeptide involved in hypothalamic GnRH release (6). The finding that arcuate NKB expressing neurons do not project to the primary capillary plexus of the portal system indicates that NKB is unlikely to be a Hypophysiotropic hormone with a direct action on the pituitary and therefore also argues in favor of an hypothalamic modulation of GnRH secretion of TAC3/TACR3 signaling pathway (7). However, there is no suitable mouse model, because tacr3 knockout mice are fertile (8, 9), to address this important pathophysiological issue.

Here we examined whether mutations in *TAC3* and *TACR3* might result in gonadotropin deficiency of hypothalamic origin (*i.e.* secondary to GnRH deficiency) that could be reversed by pulsatile GnRH administration (10).

Subjects and Methods

Case reports

The family 1 propositus (Fig. 1A) was a 31-yr-old man originating from Kinshasa, Democratic Republic of Congo (Bacongo ethnic group), who was referred to our department for hypogonadism. During the interview he stated that pubertal development had never occurred and that his parents, who died during the civil war, were first cousins. He had typical hypogonadism, with small testes (2 ml), sparse pubic hair (P3), and a penis of 6 cm. His height was 181 cm and his weight 86 kg. The karyotype was normal (46, XY). His sense of smell was normal on olfactometry. Pituitary magnetic resonance imaging (MRI) and renal sonography were normal. Plasma testosterone and serum LH levels were very low, but the serum FSH level was in the normal range (Table 1).

The family 2 index case (Fig. 1A) was a young man originating from Kinshasa, Democratic Republic of Congo (Yanzi ethnic group), who was referred at age 21 yr because pubertal development had not occurred. He had typical signs of complete hypogonadism, with small intrascrotal testes (3 ml), sparse pubic hair (P2), and micropenis. His height was 191 cm, his weight 78 kg, and his bone age 15.0 yr. He had a normal sense of smell on olfactometry and had no renal or craniofacial abnormalities. MRI of the pituitary gland and olfactory bulbs was normal. His karyotype was normal (46, XY). He had very low levels of plasma testosterone and serum LH, but his FSH level was normal (Table 1).

The family 3 proband (Fig. 1A) was a 26-yr-old woman originating from Haiti who was adopted at age 1 yr by a couple living in Belgium. She was referred for primary amenorrhea and absent breast development. At diagnosis her height was 165 cm and her Tanner breast stage was 1, whereas her pubic and axillary hair stages were 3 and 2, respectively. Her bone age was 16 yr. Pelvic sonography revealed small ovaries bearing a few small follicles (<3 mm) and a small uterus. The karyotype was normal (46, XX). Her sense of smell was normal on olfactometry, as were pituitary MRI and renal sonography. Hormonal evaluation confirmed the complete hypogonadotropic hypogonadism (Table 1).

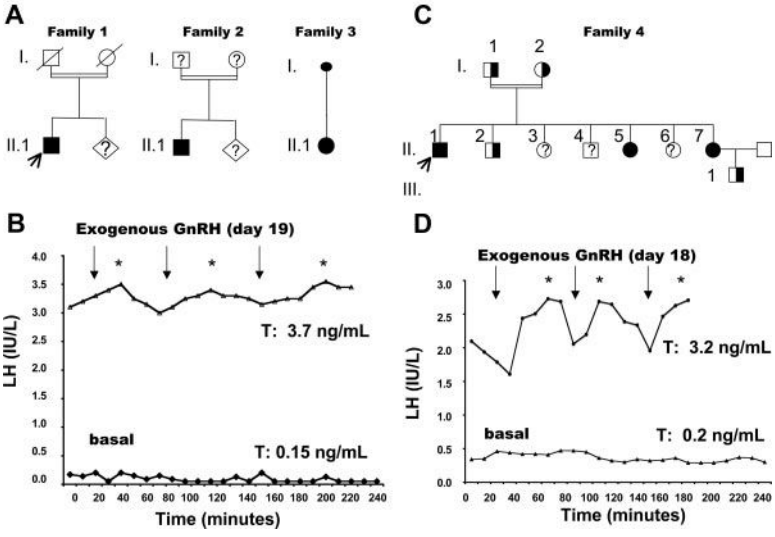


FIG. 1. Family pedigrees and LH pulsatility studies. A, Pedigrees of the three patients with homozygous *TAC3* c.209-1G>C mutation. In families 1 and 2, the patients with normosmic CHH were political refugees originating from the Democratic Republic of Congo, whose parents were first-degree cousins in both cases. In family 3, the female patient, originating from Haiti, was adopted. None of the relatives were therefore available for genetic studies. Basal and GnRH-stimulated LH pulsatility was studied in the patient indicated by the *arrow*. C, Pedigree of a family with homozygous *TACR3* mutation c.738-1G>A. The proband, subject II-1 (*arrow*), and his two affected sisters (subjects II-5 and II-7), were homozygous for the c.738-1G>A mutation. The unaffected brother (II-2) and parents (I-1 and I-2) and the child (III-1) of subject II-7 were heterozygous for the mutation. *Solid symbols* indicate affected subjects and *half-shaded symbols* indicate unaffected heterozygotes. *Circles* represent female family members and *squares* male family members. ?, Patients unavailable for genetic study. B and D, Pattern of LH secretion in two men with complete normosmic CHH due to NKB invalidation (subject II-1, family 1) and NK3R truncation (subject II-1, family 4), respectively. In both individuals, basal LH secretion was very deficient and nonpulsatile, and pulsatility was restored by pulsatile GnRH administration. LH secretion was evaluated before GnRH treatment during 4 h and also evaluated during 4 and 3 h, respectively, on d 19 and 18 of pulsatile GnRH administration. *Arrows* indicate the GnRH boluses and *asterisks* denote detectable pulses, analyzed with Thomas' algorithm (10–12). Plasma testosterone (T) levels, which were very low before GnRH treatment, increased after pulsatile GnRH administration in both patients, indicating testicular stimulation. Conversion to SI units: testosterone, nanograms per milliliter × 3.467 = nanomoles per liter. Testosterone normal range in men is 2.8–9.0 ng/ml.

TABLE 1. Clinical and hormonal characteristics in the patients with *TAC3* or *TACR3* mutations

	Gene mutated					
	TAC3			*TACR3*		
Family number	**1**	**2**	**3**	**4**		
Subject	II-1	II-1	II-1	II-1	II-5	II-7
Mutation		c.209-1G>C/c.209-1G>C			c.738-1G>A/c.738-1G>A	
Sex/age at diagnosis (y)	M/31	M/21	F/26	M/28	F/26	F/23
Reproductive phenotype at diagnosis	Micropenis, mean TV: 2 ml	Micropenis, mean TV: 3 ml	Primary amenorrhea, absent breast development	Micropenis, mean TV: 2 ml	Primary amenorrhea, absent breast development	Primary amenorrhea, absent breast development
Reproductive phenotype in parents/ heterozygous kindred		Possibly normal?[a]			Normal	
Testosterone (ng/ml)/ estradiol (pg/ml)	0.15/	0.20/	/12	0.20/	/5	/12
FSH (IU/liter) basal→stimulated[b]	3.2→12.8	3.9→13.5	1 .3→6.6	0.8→4.0	2.1	2.0
LH (IU/liter) basal→stimulated[b]	0.1→2.8	0.1→3.4	0.2→2.4	0.1→0.8	0.2	0.15
Other anterior pituitary dysfunctions	No	No	No	No	No	No
Anosmia or associated signs	No	No	No	No	No	No

Normal range in adults: LH, 2.8–7.1 IU/liter; FSH, 2.4–7.0 IU/liter; testosterone, 2.8–9.0 ng/ml; estradiol, 24–90 pg/ml (early follicular phase). TV, Mean testicular volume.

[a] From propositus interrogation: eugonadal parents, unassisted conception, and normal pregnancies.

[b] GnRH: 100 μg iv.

In family 4, originating from Senegal (Suninke ethnic group), three of the seven children of consanguineous (first cousin) parents were found to have normosmic CHH. The index case was a young man (subject II-1, Fig. 1C) who was referred at age 28 yr because pubertal development had not occurred. He had typical signs of complete hypogonadism, with small intrascrotal testes (2 ml), sparse pubic hair (P3), and a 6-cm penis. His height was 170 cm and his weight 84 kg. He had a normal sense of smell on olfactometry and had no renal or craniofacial abnormalities. His karyotype was normal (46, XY). His two affected sisters (subject II-5 and subject II-7, Fig. 1C), who were evaluated at ages 26 and 23 yr, respectively, also had complete hypogonadism and a normal sense of smell. At diagnosis, both sisters had absent breast development and sparse pubic hair. Menarche had not occurred. In subject II-7, pelvic sonography showed a small uterus (3.4 ml) and two small ovaries (right, 1.3 ml; left, 1.4 ml), with four visible follicles, each less than 3 mm in diameter. The karyotype was 46, XX in both cases. MRI of pituitary and olfactory bulbs was normal in all the affected siblings. Hormone assays revealed a very low plasma testosterone level in the propositus and very low plasma estradiol levels in the two affected sisters; all the affected siblings had very low levels of serum LH and low to normal serum FSH (Table 1).

Menarche had occurred at age 12 yr in the mother (subject I-2, Fig. 1C), who reported having had spontaneous regular menses, unassisted conception, and normal pregnancies. The father (subject I-1, Fig. 1C) reported normal pubertal development with virilization and a growth spurt at age 13 yr and normal sexual function.

In the younger affected sister (subject II-7, Fig. 1C), 6 months of combined estrogen-progestin replacement therapy induced breast development, an increase in uterus length, and regular menses. Three weeks after the end of this therapy, she still had nonpulsatile LH secretion, very low estradiol and gonadotropin levels, an undetectable serum inhibin B level, and an unchanged ovarian aspect on sonography. Pulsatile GnRH administration (80 ng/kg · pulse, every 90 min, sc) was started because she wanted to conceive, resulting 18 d later in increased circulating levels of gonadotropins and estradiol, appropriate endometrial thickening, and recruitment of a single dominant follicle of 19 mm. Two weeks later, while still receiving pulsatile GnRH therapy, her progesterone concentration rose to a luteal-phase level. She conceived (human chorionic gonadotropin: 387 IU/liter), and sonography confirmed a viable intrauterine singleton pregnancy. Three months later, high circulating levels of human chorionic gonadotropin (32 100 IU/liter), estradiol (998 pg/ml), and progesterone (54 ng/ml) confirmed that the pregnancy was ongoing. The pregnancy was otherwise uneventful and at wk 40, she gave birth to a boy.

All affected patients studied here had otherwise normal circulating iron and ferritin, normal prolactin, and normal pituitary, adrenal, and thyroid functions, and none had any other clear neurobehavioral or other phenotypic abnormalities; in particular, all had normal learning ability.

Hormone assays

We measured serum levels of LH, FSH, and inhibin B and plasma levels of testosterone and estradiol using immunoradiometric assay, ELISA, or RIA, as reported previously (10–12). Endogenous LH secretion, analyzed with Thomas' algorithm, was evaluated overnight at 10-min intervals, as reported elsewhere (10–12) (see legend, Fig. 1, B and D).

DNA analysis

All the participants and controls gave their written informed consent for genetic analyses, which were approved by the local ethics committee. Genomic DNA was extracted from white blood cells by using standard procedures.

Coding exons 2-6 and intron-exon junctions of *TAC3*, and coding exons 1-5 and intron-exon junctions of *TACR3*, were amplified by means of the PCR and were sequenced as previously described with minor modifications (1).

GNRHR, *GNRH1*, *KISS1R (GPR54)*, *KISS1*, and *FGFR1* were also analyzed as previously described with minor modifications (10, 13–16).

To rule out a deletion of *TAC3* (*i.e.* to exclude hemizygosity), we determined the *TAC3* gene copy number by real-time quantitative PCR (see the Supplemental Material, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at http://jcem.endojournals.org).

Microsatellites surrounding the *TAC3* mutation were analyzed as previously described (10). Single nucleotide polymorphisms were identified by direct sequencing.

Analysis of TAC3 and TACR3 mRNA

White blood cells isolated from patient II.1 (family 1) were used to study splicing of TAC3 RNA to specify the *in vivo* consequences of the *TAC3* mutation.

Fibroblasts cultured from a skin biopsy sample (obtained after informed written consent) from patient II.1 (family 4) were used to study splicing of TACR3 RNA to specify the *in vivo* consequences of the *TACR3* mutation. Fibroblasts (passages 1–10) were cultured at 37 C with 5% CO_2 in DMEM high-glucose (4.5 g/liter), 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, and 10% fetal calf serum (pH 7.4). Total RNAs were extracted with the Trizol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and reverse transcribed to cDNA by using random primers and the high-capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems, Foster City, CA).

TAC3 and *TACR3* were amplified by PCR from cDNA using oligonucleotides shown in Supplemental Table 1. PCR product sizes were estimated by electrophoresis on agarose gel.

Results

Hormonal evaluation

Hormonal evaluation in families 1–4 is shown in Table 1.

Gonadotropin pulsatile analysis

In subject II.1 family 1 (Fig. 1A), analysis of basal LH secretion overnight at 10-min intervals for 4 h showed very low levels of this gonadotropin and a nonpulsatile pattern (Fig. 1B). On d 19 of pulsatile GnRH administration (100 ng/kg · pulse, every 60 min, sc), pulses of LH release were detected, occurring synchronously with the GnRH boluses (Fig. 1B) and concomitantly with an increase in the plasma testosterone level.

In patient II.1, family 4 (Fig. 1C), analysis of basal LH secretion overnight at 10-min intervals for 4 h showed very low levels and a nonpulsatile pattern (Fig. 1D). On d 18 of

pulsatile GnRH administration (100 ng/kg · pulse every 60 min, sc), pulses of LH release were detected, occurring synchronously with the GnRH boluses (Fig. 1D) and concomitantly with an increase in the plasma testosterone level.

DNA and transcript analysis

In all the patients studied here *GNRH1*, *GNRHR*, *KISS1*, *KISS1R*, and *FGFR1* genes exons and intron-exon boundaries were identical with reference sequences.

We found the same homozygous *TAC3* mutation (c.209-1G>C) (see Supplemental Fig. 1) in the three propositi from families 1–3 (Fig. 1A). Unable to conduct familial studies for the reasons stated in legend to Fig. 1A, we wondered whether the mutation could be associated with a deletion on the other allele. We thus performed quantitative real-time *TAC3* PCR and found that all three patients had two copies of the *TAC3* gene. Because the mutation was located in the acceptor splice site of intron 3, causing loss of the consensus acceptor splicing sequence, we predicted an abnormal transcription product.

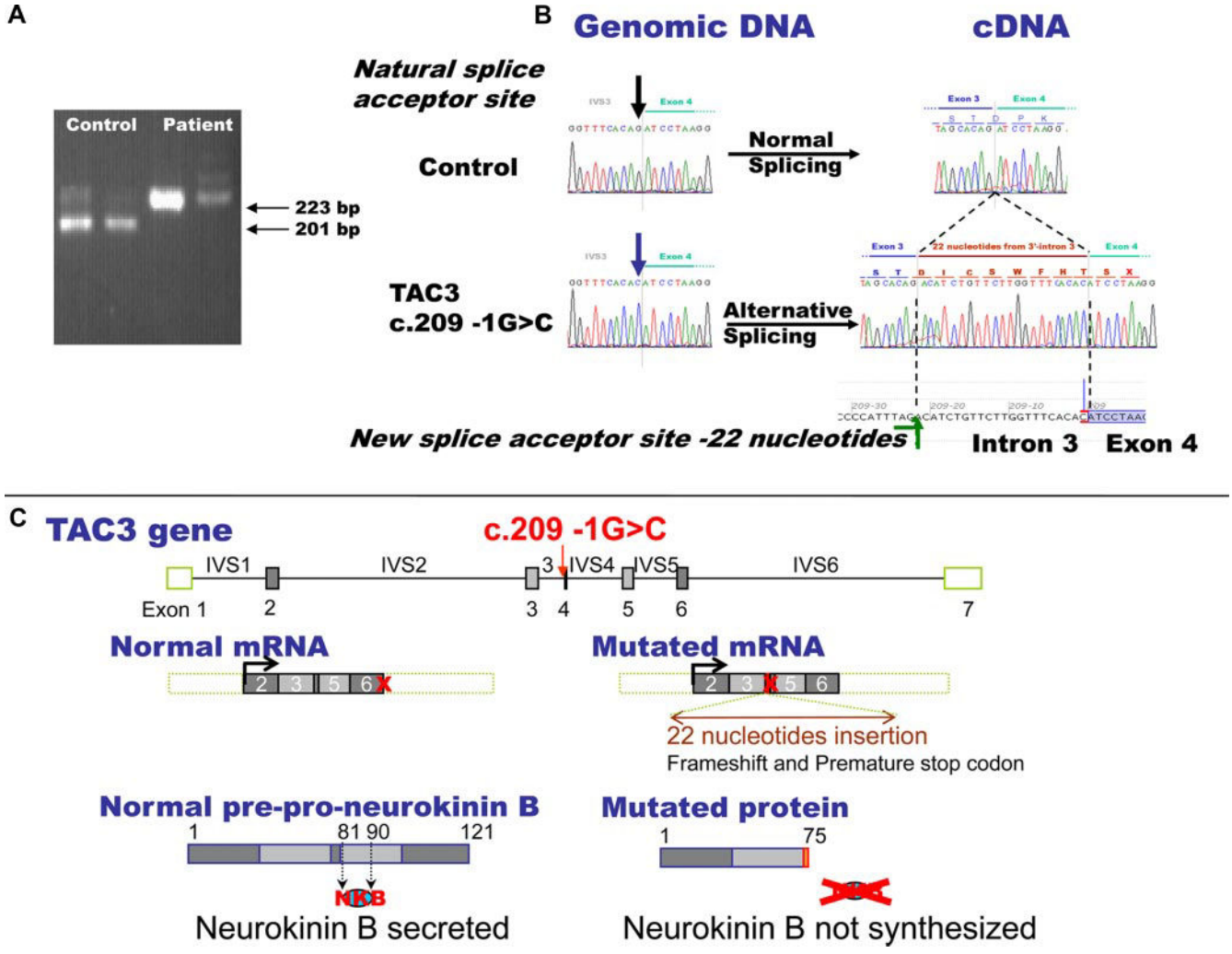


FIG. 2. Molecular characterization and functional consequences of the c.209-1G>C *TAC3* mutation. A, Electrophoretic determination of the size of RT-PCR products (duplicate) after amplification of *TAC3* cDNA obtained from white blood cell mRNA of the propositus of family 1 bearing the *TAC3* c.209-1G>C mutation by comparison with a healthy control subject. Amplification was performed using primers overlapping exon 2–3 junction and exon 5-6 junction (see Supplemental Table 1). Amplicon sizes are given on the *right*. The gain of 22 nucleotides in the patient's TAC3 cDNA was demonstrated by direct sequencing of the cDNA (see B). B, Genomic and cDNA sequencing. The TAC3 c.209-1G>C mutation leads to alternative splicing and retention of 22 nucleotides from the 3′ part of intron 3. Invalidation of the natural splice acceptor site of intron 3 reveals a cryptic site located 22 nucleotides upstream of the natural site. The natural splice acceptor site of intron 3 is indicated on genomic DNA by a *black arrow*. The mutation is indicated on genomic DNA by a *blue arrow*. The new splice acceptor site is indicated on genomic DNA by a *green arrow*. The c.209-1G>C mutation in the IVS3 acceptor splicing site unmasks a cryptic splice site in IVS 3, leading to insertion of 22 nucleotides between exons 3 and 4 in the transcript. The resulting frameshift from codon 67 is responsible for the emergence of a premature stop codon at position 76. C, Schematic representation of the *TAC3* gene, transcript, and the NKB precursor. Localization of the homozygous c.209-1G>C mutation and consequences at transcript and protein levels. Exons are represented by *quadrangles* and coding regions are *shaded*. Introns (IVS) are represented by *lines*. The normal prohormone has 121 amino acids. Cleavage by convertases generates the mature NKB decapeptide (amino acids 81-90). Premature translation termination upstream of the NKB coding region completely abolishes the NKB amino acid sequence. The *red cross* indicates the stop codon.

Using patients' white cell mRNA, we demonstrated that this mutation invalidates the natural splice acceptor site and leads to alternative splicing with a gain of 22 nucleotides (Fig. 2A). Indeed, direct sequencing of the RT-PCR product obtained from white cells mRNA showed that invalidation of the natural splice acceptor site of *TAC3* intron 3 (c.209-1G>C) revealed a cryptic splice acceptor site located at position c.209-23G, thus explaining the retention of 22 nucleotides from the 3′ part of intron 3 (Fig. 2B). This results in a frameshift from codon 67 and the emergence of a premature stop codon at position 76. The premature termination of translation upstream of the NKB coding region completely deletes the neurokinin B amino acid sequence (Fig. 2C).

This mutation was not found in 200 chromosomes from eugonadal control subjects or in 300 chromosomes from unrelated control subjects with sporadic normosmic CHH.

We found a homozygous *TACR3* mutation (c.738-1G>A) in propositus II.1 (family 4, Fig. 1C) as well as his two affected sisters. The mutation was found in the heterozygous state in an unaffected brother (II.2, Fig 1C) and both parents and patient II-7's child. This substitution, located in the splice acceptor site of intron 2 (see Supplemental Fig. 2), invalidates the natural splice acceptor site

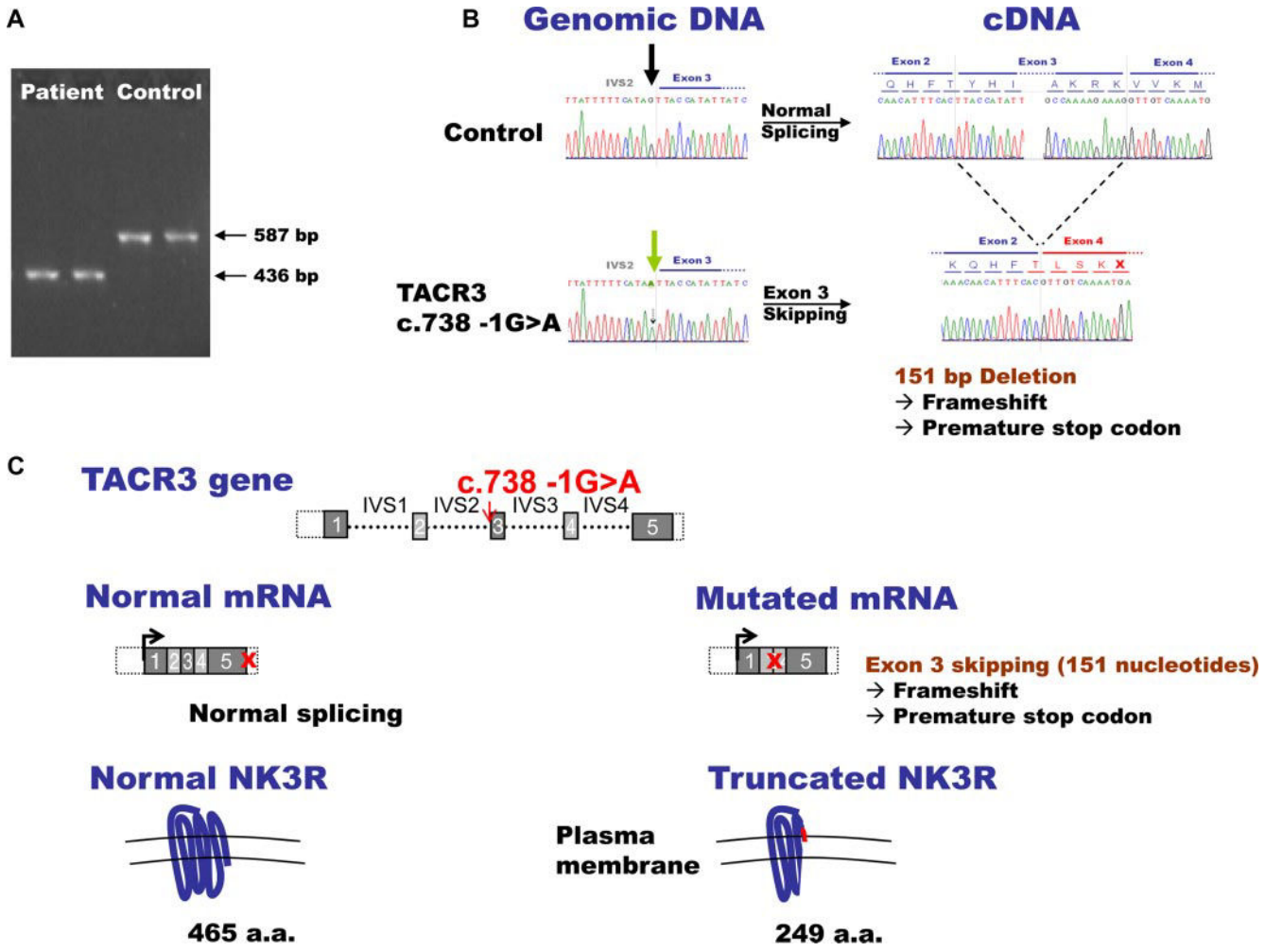


FIG. 3. Molecular characterization and functional consequences of the c.738-1G>A *TACR3* mutation. A, Electrophoretic determination of the size of RT-PCR products (duplicate) after amplification of *TACR3* cDNA from the fibroblasts of propositus of family 4 bearing the *TACR3* c.738-1G>A mutation, by comparison with a healthy control subject. Amplification was performed using primers overlapping exon 1-2 junction and exon 4 (see Supplemental Table 1). Amplicon sizes are shown on the *right*. The loss of 151 nucleotides in the patient's TACR3 cDNA was demonstrated by direct sequencing of the cDNA (see B). B, Genomic and cDNA sequencing. The TAC3 c.738-1G>A mutation leads to alternative splicing with exon 3 skipping due to invalidation of the natural splice acceptor site of intron 2. The natural splice acceptor site of intron 2 is indicated on genomic DNA by a *black arrow*. The mutation is indicated on genomic DNA by a *green arrow*. The c.738-1G>A mutation in the IVS2 acceptor splicing site leads to exon 3 skipping and to a frameshift from codon 246, with the emergence of a premature stop codon at position 250. C, Schematic representation of the *TACR3* gene, transcript and of the NK3R protein. The effect of the homozygous c.738-1G>A mutation on the amino acid sequence of the receptor is schematized. Exons are represented by *quadrangles* and coding regions are *shaded*. Introns (IVS) are represented by *dotted lines*. Truncation of the receptor after the second extracellular loop invalidating transmembrane domains 5–7 is indicated. The *red cross* indicates the stop codon.

and leads to alternative splicing with loss of 151 nucleotides in the mRNA (Fig. 3A). Direct sequencing of the RT-PCR product obtained from subject II-1 (Fig. 1C) fibroblast mRNA showed that invalidation of the natural splice acceptor of *TACR3* intron 2 (c.738-1G>A) leads to exon 3 skipping (Fig. 3B) and the loss of 151 nucleotides. This results in a frameshift from codon 246 and in the emergence of a premature stop codon at position 250, truncation of the receptor after the second extracellular loop, invalidating transmembrane domains 5–7, and the corresponding intracellular and extracellular loops (Fig. 3C). This mutation was not found in 200 chromosomes from eugonadal control subjects or in 300 chromosomes from unrelated control subjects with sporadic normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism.

Haplotype analysis

Because the *TAC3* mutation is a rare event and we found it in three unrelated patients originating from Congo and Haiti, we suspected that this homozygous mutation resulted from a founding event in a more distant ancestor. We tested this possibility by means of haplotype analysis (Table 2). Indeed, all TAC3 209-1G>C patients share a common core haplotype, indicating that all 209-1G>C patients in the study likely share a common ancestor. What remains of the ancestral chromosome depends on the position of branches, and the size of the genealogy, expressed as a number of generations. Haplotype decay may be used as a genetic clock, taking into account all the possibilities for linking mutation carriers from the present study. Within this geometric Bayesian approach to the problem of genealogical uncertainty, the age of the common ancestor is approximately 21 generations, or 600 yr (17).

TABLE 2. Microsatellites and single nucleotide polymorphisms surrounding the homozygous mutation, TAC3 c.209-1G>C, in the three propositi from unrelated families 1, 2, and 3

Markers	Genotyping Family 1 II.1		Genotyping Family 2 II.1		Genotyping Family 3 II.1		Distance (megabases)	Heterozygozity*	Number of alleles*
D12S 345	237	239	219	241	221	231	-23,47	88,9	10
D12S 1663	242	242	230	244	242	244	-13,13	60,7	11
D12S 85	121	121	-	-	117	117	-10,07	67,9	8
D12S 368	206	206	216	218	206	206	-4,77	85,7	8
rs 73114428	*wt*	*wt*	*wt*	*wt*	*wt*	*wt*		No Data	2
rs 28439289	*wt*	*wt*	*wt*	*wt*	*wt*	*wt*		No Data	2
TAC3 c.209-1	*G>C*	*G>C*	*G>C*	*G>C*	*G>C*	*G>C*			
rs 2270734	*wt*	*wt*	*wt*	*wt*	*wt*	*wt*		1,9	2
rs 73334764	*wt*	*wt*	*wt*	*wt*	*wt*	*wt*		No Data	2
D12S 1644	163	163	163	159	163	163	0,09	50,0	4
D12S 355	187	187	187	187	181	181	1,92	70,4	12
D12S 1700	172	172	172	174	168	168	2,61	82,1	7
D12S 83	-	-	108	108	110	110	3,43	81,0	11
D12S 313	208	210	208	204	208	208	11,09	70,4	9
D12S 351	162	158	162	204	154	164	34,73	78,6	6

The homozygote region is *boxed* for each family. The common haplotype is *shaded*.

[a] Data from CEPH Fondation Jean Dausset.

Discussion

We describe here the detection of *TAC3* and *TACR3* gene inactivation in normosmic CHH patients and the functional impact on the gonadotropic axis of the resulting deletion of NKB and truncation of its receptor NK3R. The restoration of circulating LH and testosterone levels in two of the males and ovulation in one female by pulsatile GnRH treatment demonstrated that the integrity of these two novel factors, whose neuroendocrine role was discovered only a few months ago (1), are crucial for the activation of the hypothalamic GnRH pulse generator and therefore for neuroendocrine control of the onset of puberty in humans. The demonstration of the key role of NKB, via its receptor NK3R, in hypothalamic GnRH secretion in human beings is of particular interest for basic physiology, given the lack of a suitable mouse model to date.

We also show that this novel cause of normosmic CHH can affect people of different origins and is not therefore restricted to the particular ethnic groups reported initially (1, 9). Using a haplotype analysis, we show that all the TAC3 209-1G>C mutated patients likely share a common ancestor. The time, in generations, to the common ancestor has been calculated as approximately 21 generations (17). This estimation is compatible with the hypothesis that the mutation is a marker of African slave trade to Haiti and Caribbean islands. Because the frequency of heterozygotes mutation carriers is much higher, approximately 50–100 times more frequent, than homozygous patients for recessive diseases, the mutation may turn out to be a good marker for mapping past population movements through trans-Atlantic slave trade.

Interestingly, in several patients reported here, we observed a dissociation between the very low basal LH and normal or nearly normal basal FSH levels, this gonadotropin responding excessively to the GnRH challenge test. This particular hormonal profile was also observed in patients with *TACR3* mutations reported by Topaloglu (1). In addition, pulsatility profiles provided here clearly show a dissociation between FSH and LH levels in two patients with TAC3 mutations, which contrasts with the profiles observed in other genetic forms of CHH of hypothalamic (Fig. 4) or pituitary (Fig. 5) origin, evaluated with the same FSH and LH assays. Taken together our results suggest the possibility of a specific neuroendocrine impairment and therefore pulsatile delivery of GnRH in patients with alteration of NKB signaling. Indeed, in primate models, the group of Knobil *et al.* (18) has clearly demonstrated that one pulse per hour of GnRH sustains both gonadotropin synthesis and secretion, whereas slower frequencies result in a decline in LH secretion but a rise in FSH secretion.

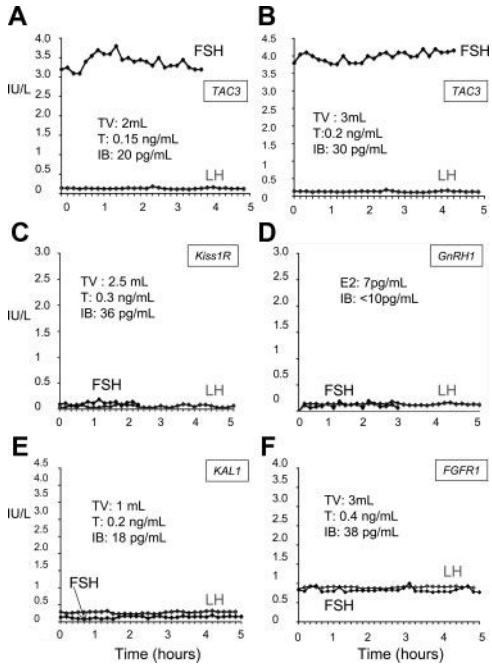


FIG. 4. Baseline secretory pattern of gonadotropins FSH and LH in two adult male patients with the homozygous c.209-1G>C TAC3 mutation comparatively to four subjects with hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism of different genetic causes. A, Subject II-1 of family 1 with *TAC3* mutation (see Fig. 1). B, Subject II-1 of family 2 with *TAC3* mutation (see Fig. 1). C, Twenty-seven-year-old male patient with normosmic CHH and the compound heterozygous L102P/X399R loss of function mutations in KISS1R. D, A 17-yr-old female patient with the homozygous c.18-19insA GnRH1 (this patient was in part described in Ref. 10). E and F, Two male patients with Kallmann syndrome caused, respectively, by a deletion in KAL1 (37 yr old) and the p.V607M FGFR1 loss of function mutation (39 yr old) (these two patients were in part reported in Ref. 11). In all the 6 patients FSH and LH were measured with the same ultrasensitive IRMA assays (see Refs. 10, 11, and 13). TV, Mean testicular volume; T, plasma testosterone levels; E2, plasma estradiol level; IB, serum inhibin B.

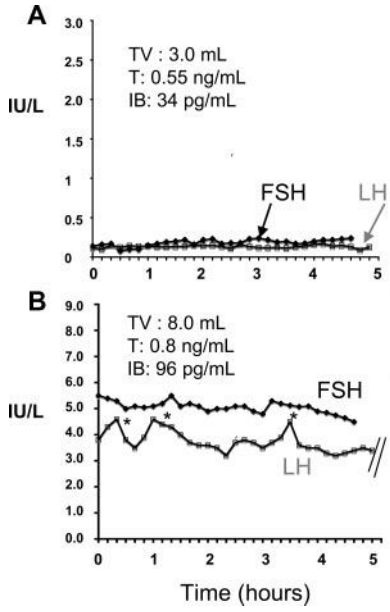


FIG. 5. Baseline secretory pattern of gonadotropins FSH and LH in two patients with GnRH receptor mutations. A, A 30-yr-old adult male CHH patient with complete CHH caused by the Arg262Gln/Gln106Arg+Ser217Arg compound heterozygous mutations of the GnRH receptor gene. This patient was in part reported elsewhere (22). B, A 22-yr-old man with partial CHH caused by the Gln106Arg/Arg262Gln compound heterozygous mutations of the GnRH-receptor gene. This patient was in part reported elsewhere (13). *Asterisks* denote LH pulses. In both patients FSH and LH were measured with the same ultrasensitive IRMA assays (see Refs. 10, 11, and 13) than in patients showed in Fig 4. TV, Mean testicular volume; T, plasma testosterone levels; IB, serum inhibin B.

Interestingly, this particular gonadotropin profile is similar to those reported in women with functional hypothalamic amenorrhea (19, 20). This similarity raises the hypothesis of an alteration in NKB signaling in subjects with undernutrition conditions as have been previously demonstrated with the kisspeptin/G protein-coupled receptor 54 signaling (21).

However, the formal demonstration that impaired NKB signaling could specifically slower GnRH pulses frequencies and could therefore simultaneously facilitate selectively FSH release and deeply alter LH secretion needs further work.

Although our data do not rule out the possibility that NKB could have additional effects at other hypothalamic or suprahypothalamic levels, the restoration of testicular testosterone secretion by pulsatile GnRH administration excludes a major direct role of this signaling pathway at the level of the pituitary gonadotropes and/or gonads in males. Similarly, NK3R does not appear to be a critical component of ovarian steroidogenesis or gametogenesis as demonstrated by successful ovulation induction and pregnancy obtained in the female patient with the homozygote *TACR3* mutation.

In conclusion, the restoration of pulsatile LH secretion, gonadal functions, and fertility by pulsatile GnRH administration points to a hypothalamic origin of the gonadotropin deficiency in patients with normosmic CHH due to NKB invalidation or to NK3R truncation. This neuropeptide and its receptor therefore both play a crucial role in hypothalamic GnRH release in humans of different ethnic origins.

Acknowledgments

We thank C. Cogliatti and I. Boucly for their excellent technical assistance and A. Boutron for help in fibroblasts cultures. We also thank J. J. Legros for helpful discussions.

Address all correspondence and requests for reprints to: Anne Guiochon-Mantel, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique, et Hormonologie, or Jacques Young, Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction, Hôpital Bicêtre, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France. E-mail: anne.mantel@bct.aphp.fr or jacques.young@bct.aphp.fr.

This work was supported by grants from the University Paris Sud 11 (Bonus Qualité Recherche), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Agence Nationale de la Recherche Genopath, and Fondation pour la Recherche Médicale.

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

References

1. **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
2. **Latronico AC** 2009 The neurokinin B pathway in human reproduction. Nat Genet 41:269–270
3. **Burke MC, Letts PA, Krajewski SJ, Rance NE** 2006 Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. J Comp Neurol 498:712–726
4. **Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ** 2007 Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. Endocrinology 148: 5752–5760
5. **Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA** 2009 Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. J Neurosci 29:11859–11866
6. **Colledge WH** 2009 Kisspeptins and GnRH neuronal signalling. Trends Endocrinol Metab 20:115–121
7. **Krajewski SJ, Anderson MJ, Iles-Shih L, Chen KJ, Urbanski HF, Rance NE** 2005 Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. J Comp Neurol 489:372–386
8. **Kung TT, Crawley Y, Jones H, Luo B, Gilchrest H, Greenfeder S, Anthes JC, Lira S, Wiekowski M, Cook DN, Hey JA, Egan RW, Chapman RW** 2004 Tachykinin NK3-receptor deficiency does not inhibit pulmonary eosinophilia in allergic mice. Pharmacol Res 50: 611–615
9. **Guran T, Tolhurst G, Bereket A, Rocha N, Porter K, Turan S, Gribble FM, Kotan LD, Akcay T, Atay Z, Canan H, Serin A, O'Rahilly S, Reimann F, Semple RK, Topaloglu AK** 2009 Hypogonadotropic hypogonadism due to a novel missense mutation in the first extracellular loop of the neurokinin B receptor. J Clin Endocrinol Metab 94:3633–3639
10. **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
11. **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
12. **Bry-Gauillard H, Meduri G, Abirached F, Constancis E, Brailly S, Chanson P, Young J** 2008 Primary amenorrhea revealing an occult progesterone-secreting ovarian tumor. Fertil Steril 90:1198 e1191–e1195
13. **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
14. **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
15. **Luan X, Zhou Y, Wang W, Yu H, Li P, Gan X, Wei D, Xiao J** 2007 Association study of the polymorphisms in the KISS1 gene with central precocious puberty in Chinese girls. Eur J Endocrinol 157: 113–118
16. **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
17. **Hanein S, Perrault I, Gerber S, Delphin N, Benezra D, Shalev S, Carmi R, Feingold J, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J, Rozet JM, Jeanpierre M** 2008 Population history and infrequent mutations: how old is a rare mutation? GUCY2D as a worked example. Eur J Hum Genet 16:115–123
18. **Wildt L, Häusler A, Marshall G, Hutchison JS, Plant TM, Belchetz PE, Knobil E** 1981 Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. Endocrinology 109:376–385
19. **Couzinet B, Young J, Brailly S, Lebouc Y, Chanson P, Schaison G** 1999 Functional hypothalamic amenorrhea a partial and reversible gonadotropin deficiency of nutritional origin. Clin Endocrinol (Oxf) 50:229–235
20. **Welt CK, Chan JL, Bullen J, Murphy R, Smith P, DePaoli AM, Karalis A, Mantzoros CS** 2004 Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. N Engl J Med 351:987–997
21. **Roa J, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M** 2008 New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. Front Neuroendocrinol 29:48–69
22. **de Roux N, Young J, Brailly-Tabard S, Misrahi M, Milgrom E, Schaison G** 1999 The same molecular defects of the gonadotropin-releasing hormone receptor determine a variable degree of hypogonadism in affected kindred. J Clin Endocrinol Metab 84:567–572

Conclusion de l'article *Young et al. J Clin Endocrinol Metab. 2010*

Les mutations *TAC3* et *TACR3* sont une cause hypothalamique de nCHH.

Notre travail a mis en évidence une nouvelle mutation de *TAC3*, identifiée chez trois sujets non apparentés mais ayant tous les trois une ascendance africaine de la même région (deux venant de la République Démocratique du Congo et un d'Haïti dont l'ascendance africaine peut historiquement être de République Démocratique du Congo) suggérant un effet fondateur (estimé à 21 générations soit 600 ans). Nous rapportons également une nouvelle mutation *TACR3* chez un patient également d'origine africaine (sénégalaise) issu d'une famille où trois des sept enfants sont atteints. Tous sont normosmiques et les enquêtes familiales suggèrent comme dans les publications de Topaloglu et al. [73] et de Guran et al. [74], une transmission récessive pour les deux gènes. Les mutations *TAC3* et *TACR3* ne sont donc pas limitées aux populations turque et kurde originellement décrites.

Au cours de cette étude, nous avons remarqué un profil basal de sécrétion des gonadotrophines particulier et spécifique de cette cause génétique comparé à des patients portant des mutations des gènes *GNRHR, KISS1R, FGFR1* et *KAL1*. En effet, la concentration en LH sanguine est très basse et apulsatile alors que la concentration de FSH reste proche de la normale chez ces patients mutés de façon biallélique pour *TAC3* ou *TACR3*. La réponse au traitement par la GnRH administrée de façon pulsatile est forte et démontre que l'origine du déficit est hypothalamique. Ce traitement permet de restaurer la pulsatilité de la sécrétion de LH à une concentration normale ainsi que l'effet gonadique (sécrétion de testostérone chez les patients de sexe masculin et ovulation chez une patiente). Ces données suggèrent que la voie de signalisation de la Neurokinine B exerce un contrôle de la pulsatilité de la GnRH différent de celle exercée par les Kisspeptines.

nCHH par mutations de *TAC3* ET *TACR3*

Article *Francou et al. PLoS One 2011*

OPEN ACCESS Freely available online PLoS one

Normosmic Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism Due to *TAC3/TACR3* Mutations: Characterization of Neuroendocrine Phenotypes and Novel Mutations

Bruno Francou[1,2,3], Jérôme Bouligand[1,2,3], Adela Voican[1,3,4], Larbi Amazit[1,3], Séverine Trabado[1,2,3], Jérôme Fagart[3], Geri Meduri[2,3], Sylvie Brailly-Tabard[1,2,3], Philippe Chanson[1,3,5], Pierre Lecomte[6], Anne Guiochon-Mantel[1,2,3*], Jacques Young[1,3,5]

Introduction de l'article *Francou et al. PLoS One 2011*

Les patients nCHH mutés pour *TAC3/TACR3* ont un profil neuroendocrinien particulier.

Suite à nos premiers travaux rapportant quatre familles présentant des mutations biallèliques *TAC3* ou *TACR3*, nous avons voulu évaluer la prévalence des mutations de ces gènes dans une large cohorte de patients nCHH et analyser de façon systématique les profils neuroendocriniens des patients afin de valider les hypothèses de corrélations génotype phénotype issues du travail précédent [172].

En 2010, Gianetti et al. [75] avait décrit une série de 345 patients issus d'un recrutement international (107 normosmiques testés, 4 hyposmiques et le reste des patients non documentés). Le génotypage retrouvait neuf patients mutés biallèliques et onze monoallèliques (5.5 %). La fréquence des sujets masculins portant des mutations et présentant un micropénis (15/16) était élevée démontrant l'importance de cette voie de signalisation durant la vie fœtale. De façon intéressante cette étude rapportait également de nombreux cas de phénotype réversible après arrêt du traitement par stéroïdes sexuels. Cette observation pouvait suggérer que la voie de signalisation de la Neurokinine B n'était pas toujours essentielle au maintien à l'âge adulte d'une sécrétion de GnRH appropriée. Six des sept hommes testés et quatre des cinq femmes montraient des signes de réversibilité de leur CHH. Bien que ce résultat soit à tempérer par le fait que seuls cinq de ces douze patients portaient des mutations biallèliques, il faut noter que deux femmes ayant des mutations biallèliques avaient présenté une fertilité spontanée. Les autres cas de réversibilité rapportés reposent sur des preuves indirectes (pulsatilité de la LH ou testostérone augmentée) sujettes à de possibles facteurs confondants.

La série décrite dans ce nouvel article [173] est de 173 patients atteints de nCHH pour lesquels la caractérisation fonctionnelle et moléculaire est homogène. Nous

rapportons cinq mutations originales de *TAC3/TACR3* pour lesquelles l'exploration clinique, familiale et moléculaire est exhaustive.

Dans ce travail, l'accent a été mis sur la caractérisation du profil neuroendocrinien à l'origine du déficit hypothalamique décrit lors du travail précédent [172] en réalisant une analyse statistique des rapports FSH/LH chez les patients atteints de CHH.

Normosmic Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism Due to *TAC3/TACR3* Mutations: Characterization of Neuroendocrine Phenotypes and Novel Mutations

Bruno Francou[1,2,3]ϑ, Jérôme Bouligand[1,2,3]ϑ, Adela Voican[1,3,4], Larbi Amazit[1,3], Séverine Trabado[1,2,3], Jérôme Fagart[3], Geri Meduri[2,3], Sylvie Brailly-Tabard[1,2,3], Philippe Chanson[1,3,5], Pierre Lecomte[6], Anne Guiochon-Mantel[1,2,3]*¶, Jacques Young[1,3,5]¶

1 Univ Paris-Sud, Faculté de Médecine Paris-Sud UMR-S693, Le Kremlin Bicêtre, France, **2** Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Le Kremlin Bicêtre, France, **3** INSERM U693, IFR93, Le Kremlin-Bicêtre, France, **4** Universitatea de medicina si farmacie, Craiova, Romania, **5** Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction and Centre de Référence des Maladies Endocriniennes Rares de la Croissance, Le Kremlin Bicêtre, France, **6** Service d'Endocrinologie, Hôpital Bretonneau, Tours, France

Abstract

Context: *TAC3/TACR3* mutations have been reported in normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism (nCHH) (OMIM #146110). In the absence of animal models, studies of human neuroendocrine phenotypes associated with neurokinin B and NK3R receptor dysfunction can help to decipher the pathophysiology of this signaling pathway.

Objective: To evaluate the prevalence of *TAC3/TACR3* mutations, characterize novel *TACR3* mutations and to analyze neuroendocrine profiles in nCHH caused by deleterious *TAC3/TACR3* biallelic mutations.

Results: From a cohort of 352 CHH, we selected 173 nCHH patients and identified nine patients carrying *TAC3* or *TACR3* variants (5.2%). We describe here 7 of these *TACR3* variants (1 frameshift and 2 nonsense deleterious mutations and 4 missense variants) found in 5 subjects. Modeling and functional studies of the latter demonstrated the deleterious consequence of one missense mutation (Tyr267Asn) probably caused by the misfolding of the mutated NK3R protein. We found a statistically significant ($p<0.0001$) higher mean FSH/LH ratio in 11 nCHH patients with *TAC3/TACR3* biallelic mutations than in 47 nCHH patients with either biallelic mutations in *KISS1R*, *GNRHR*, or with no identified mutations and than in 50 Kallmann patients with mutations in *KAL1*, *FGFR1* or *PROK2/PROKR2*. Three patients with *TAC3/TACR3* biallelic mutations had an apulsatile LH profile but low-frequency alpha-subunit pulses. Pulsatile GnRH administration increased alpha-subunit pulsatile frequency and reduced the FSH/LH ratio.

Conclusion: The gonadotropin axis dysfunction associated with nCHH due to *TAC3/TACR3* mutations is related to a low GnRH pulsatile frequency leading to a low frequency of alpha-subunit pulses and to an elevated FSH/LH ratio. This ratio might be useful for pre-screening nCHH patients for *TAC3/TACR3* mutations.

Citation: Francou B, Bouligand J, Voican A, Amazit L, Trabado S, et al. (2011) Normosmic Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism Due to *TAC3/TACR3* Mutations: Characterization of Neuroendocrine Phenotypes and Novel Mutations. PLoS ONE 6(10): e25614. doi:10.1371/journal.pone.0025614

Editor: Manuel Tena-Sempere, University of Córdoba, Spain

Received June 24, 2011; **Accepted** September 7, 2011; **Published** October 21, 2011

Copyright: © 2011 Francou et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported in part by grants from Paris-Sud 11 University (Bonus Qualité Recherche 2009), INSERM ANR KalGenopath 09-GENO-017, PHRC HYPOPROTEO P081212 and Fondation pour la Recherche Médicale. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: anne.mantel@bct.aphp.fr

ϑ These authors contributed equally to this work.

¶ These authors also contributed equally to this work.

Introduction

In the last two years, loss-of-function mutations in *TAC3* (MIM 162330) and *TACR3* (MIM 162332), the genes encoding neurokinin B (NKB) and its receptor NK3R, respectively, have been described in patients with non syndromic normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism (nCHH) (OMIM #146110), pointing to a fundamental role of this pathway in the physiology of the human gonadotrope axis [1–5]. The precise mechanisms by which these mutations cause gonadotropin deficiency and CHH are not yet clear [6], although we recently noted GnRH deficiency in such nCHH patients [3]. In rodents [7], sheep [8,9], goat [10] and non human primates [11], NKB is expressed throughout the brain [12] and particularly by the same neurons that express kisspeptin and dynorphin. In rats, these neurons form a bilateral, interconnected network that projects to

NK3R-expressing GnRH terminals in the median eminence [13]. Kisspeptins have a recognized effect on GnRH secretion [14]. In contrast, the neuroendocrine role of NKB is controversial, as agonists may have either inhibitory or excitatory effects, depending on the animal model and gender [11,15–18]. In addition, *Tacr3* knock-out mice seem to be fertile [19] and the phenotype of the murine *Tac2* knock-out (ortholog of human *TAC3*) has not been yet reported. Detailed neuroendocrine studies of adult nCHH patients with *TAC3/TACR3* mutations may help to decipher the role of this signaling pathway in the pathophysiology of the gonadotrope axis.

The aims of the present work were 1) to evaluate the prevalence of variants in the *TAC3* and *TACR3* genes in our cohort of nCHH patients; 2) to characterize newly identified mutants responsible for nCHH, at the molecular and functional levels and 3) to examine the neuroendocrine profile of patients with biallelic *TAC3/TACR3* mutations to evaluate the hypothesis that NKB and its receptor participate in controlling the frequency of GnRH secretory pulses.

Patients

From a cohort of 352 patients with CHH we selected 173 patients with normosmic nCHH and screened for *TAC3* and *TACR3* mutations. Gonadotropin deficiency in this setting is characterized by: 1) absent or incomplete puberty at age 18 years; 2) low plasma testosterone levels in men and low to low-normal estradiol levels in women plus low or normal serum gonadotropin levels; 3) otherwise normal pituitary function; 4) normal serum ferritin concentrations; 5) normal magnetic resonance imaging (MRI) of the hypothalamic-pituitary region; and 6) a normal sense of smell on olfactometry, and no anosmia/hyposmia in relatives [20].

Neuroendocrine profiling of *TAC3/TACR3*-mutated nCHH patients

Since Topaloglu et al. first reported that *TAC3/TACR3* mutations can cause nCHH, studies of published pedigrees have shown that the transmission of this genetic form is autosomal recessive [1–4]. Thus, to study the pulsatility of gonadotropin and free alpha subunit secretion in nCHH patients harboring *TAC3/TACR3* mutations, we enrolled only patients with biallelic mutations, comprising 2 men partially described elsewhere [3] and a new female patient (see Case Reports). Free alpha subunit secretion was evaluated because it has been proposed as the best surrogate for GnRH secretion in nCHH patients with an apulsatile LH profile [21–23].

On the same way, for FSH/LH ratio studies, we included 11 patients with biallelic *TAC3/TACR3* mutations, of whom 6 are partially described elsewhere [3] and 5 are novel (see Case Reports). The FSH/LH ratios in these 11 patients were compared, using the same assays (see below), with those in patients with CHH of different genetic origins, namely 4 patients with biallelic mutations in *KISS1R*, 11 with biallelic mutations in *GNRHR*, 32 nCHH patients with no identified mutations in genes known to cause nCHH and also with those of 50 patients with Kallmann syndrome and mutations in *KAL1* (n = 19) or *FGFR1* (n = 17), or *PROK2/PROKR2* (n = 14) (Information S1).

Results

Case reports

In **family 1,** three sisters were affected. The proband (subject II-6, Fig. 1A) was a young woman from a consanguineous family originating from Reunion Island. She was referred at age 24 years because pubertal development and menses had not occurred. She had typical signs of complete hypogonadism, with no breast development but the presence of pubic hair (P4). Her height was 164 cm, her weight 58 kg, and her bone age 14 years. Pelvic sonography showed a small uterus (34 mm high, 28 mm wide, 22 mm thick) and two small ovaries (right, 0.84 mL; left, 1.48 mL), with a few follicles less than 4 mm in diameter. Her karyotype was normal (46, XX). Combined estrogen-progestin replacement therapy induced breast development, an increase in uterus length, and regular menses. Hormonal evaluation after the end of this therapy showed that she still had very low estradiol and LH levels, an undetectable serum inhibin B level, but normal FSH levels as well as a nonpulsatile LH secretion, and an unchanged ovarian aspect on sonography. Pulsatile GnRH administration (90 ng/kg/pulse, every 90 minutes, subcutaneously) was started because she wished to conceive, resulting in increased circulating levels of LH, estradiol and inhibin B, appropriate endometrial thickening, and recruitment of a single dominant follicle of 20 mm. Eleven days later, while still receiving pulsatile GnRH therapy, her progesterone concentration rose to a luteal-phase level (19 ng/mL) and ultrasonography showed the typical aspect of a corpus luteum. This patient's older affected sister (subject II-5, Fig. 1A), who was evaluated at age 21 years, also had complete hypogonadism and a normal sense of smell. At diagnosis, she had no breast development and sparse pubic hair. Menarche had not occurred. The proband's younger affected sister (subject II-8, Fig. 1A) was 19 years old when first seen for primary amenorrhea and absent breast development. She was born at term with a normal birth weight after an uncomplicated pregnancy, and grew and developed normally until her early to mid-teen years. On examination, her height was 168 cm and her BMI 23 kg/m^2. She was at Tanner breast stage 1, pubic hair stage 3, and axillary hair stage 2. Her bone age was 13.5 years at diagnosis.

At diagnosis, the 3 sisters had very low plasma estradiol levels (7.0, 10.7 and 8.6 pg/mL respectively; normal range in the early follicular phase: 22–90 pg/mL) and very low serum LH levels (0.05, 0.1, and 0.16 IU respectively; normal range 2.8–7.1 IU/L), while their FSH levels were normal for the early follicular phase (3.7, 4.3, and 4.6 IU/L respectively; normal range: 2.4–7.0 IU/L). Serum inhibin B levels were undetectable (<10 pg/mL) in the propositus and her older affected sister at diagnosis.

The **family 2** proband (subject II–1, Fig. 1B) was a Caucasian French man born to non consanguineous eugonadal French parents. He was referred at age 19 years-old for absent pubertal development. Physical examination showed typical signs of hypogonadism, with small testes (mean volume: 0.8 mL, normal range in men: 15–30 mL). His height was 180 cm and his weight 68 kg. His karyotype was normal (46, XY). His medical history indicated that he was first referred to a pediatric endocrinologist at age 8 years for micropenis (2.5 cm) and bilateral cryptorchidism, for which he was operated on at age 19 years. At diagnosis he had very low levels of plasma testosterone (0.2 ng/mL; normal range: 2.8–9.0 ng/mL) and serum LH (0.2 IU/L), but his serum FSH (5.4 IU/L) was normal for age and responded (peak: 8.0 IU/L) to GnRH challenge (100 µg intravenously). He was recently reevaluated in September 2010 at 46 years old after a four months interruption of androgen therapy: mean testicular volume was at 1 mL, serum testosterone (0.3 ng/mL) and serum inhibin B (12 pg/mL) were very low; serum LH was low (0.3 IU/L) and FSH was in the normal range (4.4 IU/L).

The **family 3** proband (subject II-1, Fig. 1C) was a Caucasian French man born to non consanguineous eugonadal French parents. He was referred at age 18 years for absent pubertal development. Physical examination showed typical signs of hypogonadism, with small intrascrotal testes (2 mL). His height was 183 cm and his weight 65 kg. His karyotype was normal (46,

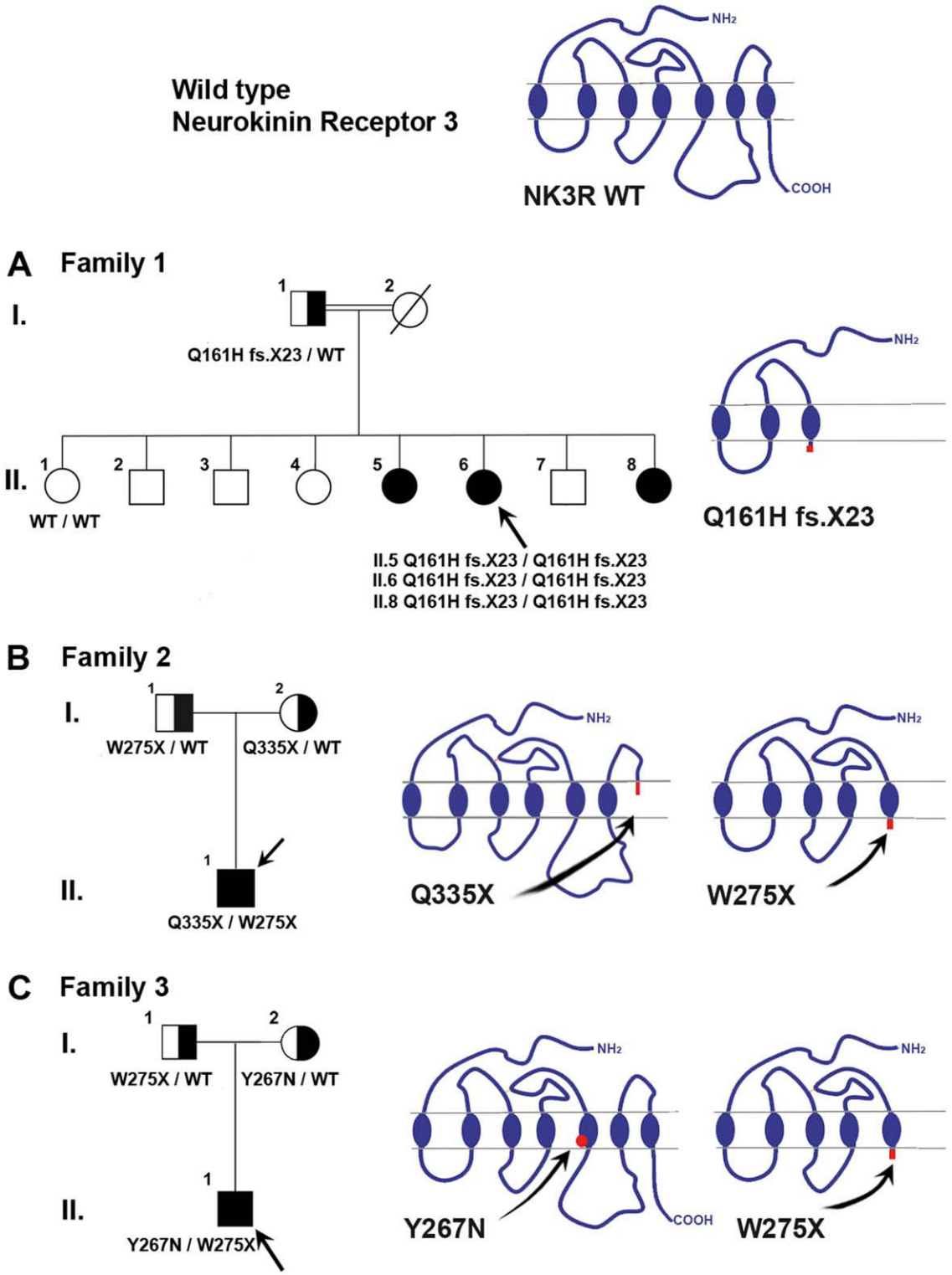


Figure 1. Family pedigrees and consequences of *TACR3* mutations on NK3R structure. Panel A. Pedigree of the family with homozygous *TACR3* c.483_499 deletion. The proband, subject II-6 (arrow), and her two affected sisters (subjects II-5 and II-8), were homozygous for the c.483_499 deletion. The unaffected father (I-1) was heterozygous for the mutation. The unaffected sister (II-1) carried homozygous wild-type alleles. This deletion results in the emergence of a premature stop codon (Q161HfsX23), truncating NK3R after the third transmembrane segment. Panel B. Pedigree of the family with compound heterozygous *TACR3* mutations c.824G>A and c.1003C>T. The proband, subject II-1 (arrow), was compound heterozygous for *TACR3* mutations c.824G>A and c.1003C>T. The unaffected father (I-1) was heterozygous for the c.824G>A mutation and the unaffected mother was heterozygous for the c.1003C>T mutation. The c.824G>A substitution produces a stop codon in the 5th transmembrane segment (p.W275X) of NK3R. The c.1003C>T substitution produces a stop codon in the junction between the third extracellular loop and the seventh transmembrane domain (p.Q335X) of NK3R. Panel C. Pedigree of the family with compound heterozygous *TACR3* mutations c.799T>A and c.824G>A. The proband, subject II-1 (arrow), was compound heterozygous for *TACR3* mutations c.799T>A and c.824G>A. The unaffected father (I-1) was

heterozygous for the recurent c.824G>A mutation and the unaffected mother was heterozygous for the c.799T>A mutation. This latter mutation affects a conserved amino acid in the fifth transmembrane domain (p.Y267N). Solid symbols indicate affected subjects and half-shaded symbols indicate unaffected heterozygotes. Circles represent female family members and squares male family members.
doi:10.1371/journal.pone.0025614.g001

XY). He had very low levels of plasma testosterone (0.4 ng/mL) and serum LH (0.65 IU/L), but his serum FSH (5.6 IU/L) was normal for age and responded excessively (peak: 11.5 IU/L) to GnRH challenge. Interestingly, his medical history indicated that he was first referred to a pediatric endocrinologist at age 20 months for micropenis (2.3 cm) and right cryptorchidism, for which he was operated on at age 9 years. At age 20 months his levels of testosterone (0.1 ng/mL; normal range: 0.05–0.45) and LH (0.6 IU/L; normal range: 0.1–1.1 IU/L) were in the normal range for chronological age but the FSH was slightly elevated and responded excessively to GnRH challenge (from 2.2 (basal) to 11.2 IU/L (peak); normal range at 20 months: basal, 0.2–1.6 IU/L; peak, 2.3–5.9 IU/L) [24].

All the patients studied here had normal MRI of pituitary gland and olfactory bulbs, normal sense of smell on olfactometry and had no renal or craniofacial abnormalities, normal circulating iron, ferritin, and prolactin levels, and normal pituitary, adrenal and thyroid function. None had any other clear neurobehavioral or other phenotypic abnormalities (bimanual synkinesia, dysmorphic facial features, midline anomalies, hearing loss, hypotonia, ataxia, dementia, or polyneuropathy). In particular, all had normal learning ability.

Molecular analysis

The *GNRH1, GNRHR, KISS1, KISS1R* and *FGFR1* exons and intron–exon boundaries were identical to the reference sequences in all the 173 patients studied. Of these 173 patients, 9 propositi (5.2%) carried *TAC3/TACR3* variants (1 in *TAC3* and 8 in *TACR3*) (Table 1 and Fig. S1). Two of these mutations, 1 in *TAC3* and 1 in *TACR3*, found in 4 propositi, were previously reported [3]. Here we describe 7 additional different *TACR3* variants (5 original and 2 recurrent) in 5 unrelated nCHH propositi (Table 1). Among them, 3 propositi carried biallelic *TACR3* mutations (see case reports), one propositus being homozygous (Fig. 1A), and two compound heterozygotes (Fig. 1B and 1C). In addition, we found 3 monoallelic *TACR3* variants in two nCHH propositi (Figs. S3 and S4).

In family 1 propositus, as well as in her affected sisters, we found a **homozygous *TACR3* deletion (c.483_499del)** (subjects II-6, II-5 and II-8, Fig. 1A and Fig. S2 panel A). The mutation was found in the heterozygous state in the patient's unaffected father (subject I-1, Fig. 1A and Fig. S2). The unaffected sister (subject II-1, Fig. 1A) was a wild-type homozygote (Fig. S2). This deletion results in a frameshift from codon 161 and the emergence of a premature stop codon at position 183 (Gln161HisfsX23), truncating NK3R after the third transmembrane segment (Fig. 1A and Fig. S1). This deletion was not found by genomic sequencing in 200 chromosomes from eugonadal ethnically matched subjects.

In propositus II.1 from family 2 (Fig. 1B) we found a **compound heterozygous *TACR3* mutation (c.824G>A and c.1003C>T).** The c.824G>A substitution produces a stop codon in the 5th transmembrane segment (p.Trp275Stop) of NK3R (Fig. 1B, Fig. S1 and Fig. S2, panel B). This recurrent mutation has previously been reported in the homozygous and monoallelic states by Gianetti et al. [4]. It was found in the heterozygous state in the unaffected father. The c.1003C>T substitution which produces a stop codon in the junction between the third extracellular loop and the seventh transmembrane domain (p.Gln335Stop) of NK3R (Fig. 1B, Fig. S1) was found in the heterozygous state in the unaffected mother. These 2 mutations were not found by genomic sequencing in 200 chromosomes from ethnically matched eugonadal control subjects.

In propositus II.1 from family 3 (Fig. 1C) we found a **compound heterozygous *TACR3* mutation (c.799T>A and c.824G>A).** The p.Trp275stop recurrent mutation was found in the heterozygous state in the unaffected father (Fig. S2, panel C). The c.799T>A substitution, which produces a missense mutation (p.Tyr267Asn) located in the fifth transmembrane segment of NK3R (Fig. 1C), was found in the heterozygous state in the unaffected mother (Fig. S2, panel C). These 2 mutations were not found by genomic sequencing in 200 chromosomes from ethnically matched eugonadal control.

Modeling and functional studies of the missense mutations

The Tyr267 residue is highly conserved among the three human tachykinin receptors and in all NK3R orthologs (Fig. 2A). Modeling was used to predict the potential impact of this point mutation on the three-dimensional organization of NK3R. We found that the

Table 1. One *TAC3* and 8 *TACR3** variants found in 9 propositi from a cohort of 173 normosmic CHH evaluated at Bicêtre Hospital.

Gene	Nucleotides change	Protein change	Fonctional consequences	Comment
TACR3	c.483_499del	Q161H fsX23	PTC/TP	novel
TACR3	c.689 G>A	R230H	no	novel
TACR3	c.738-1 G>A	Y247L fsX4	PTC/TP	reported in ref. 3
TACR3	c.799 T>A	Y267N	decrease MAPK activity	novel
TACR3	c.824 G>A	W275X	PTC/TP	recurrent in ref. 4
TACR3	c.857 A>G	K286R	no	recurrent (rs2276973)
TACR3	c.918 G>A	M306I	no	novel
TACR3	c.1003 C>T	Q335X	PTC/TP	novel
TAC3	c.209-1 G>C	P73I fsX9	PTC/TP	reported in ref. 3

PTC/TP: premature termination codon/truncated protein.
*see Fig. S1 in the supporting information.
doi:10.1371/journal.pone.0025614.t001

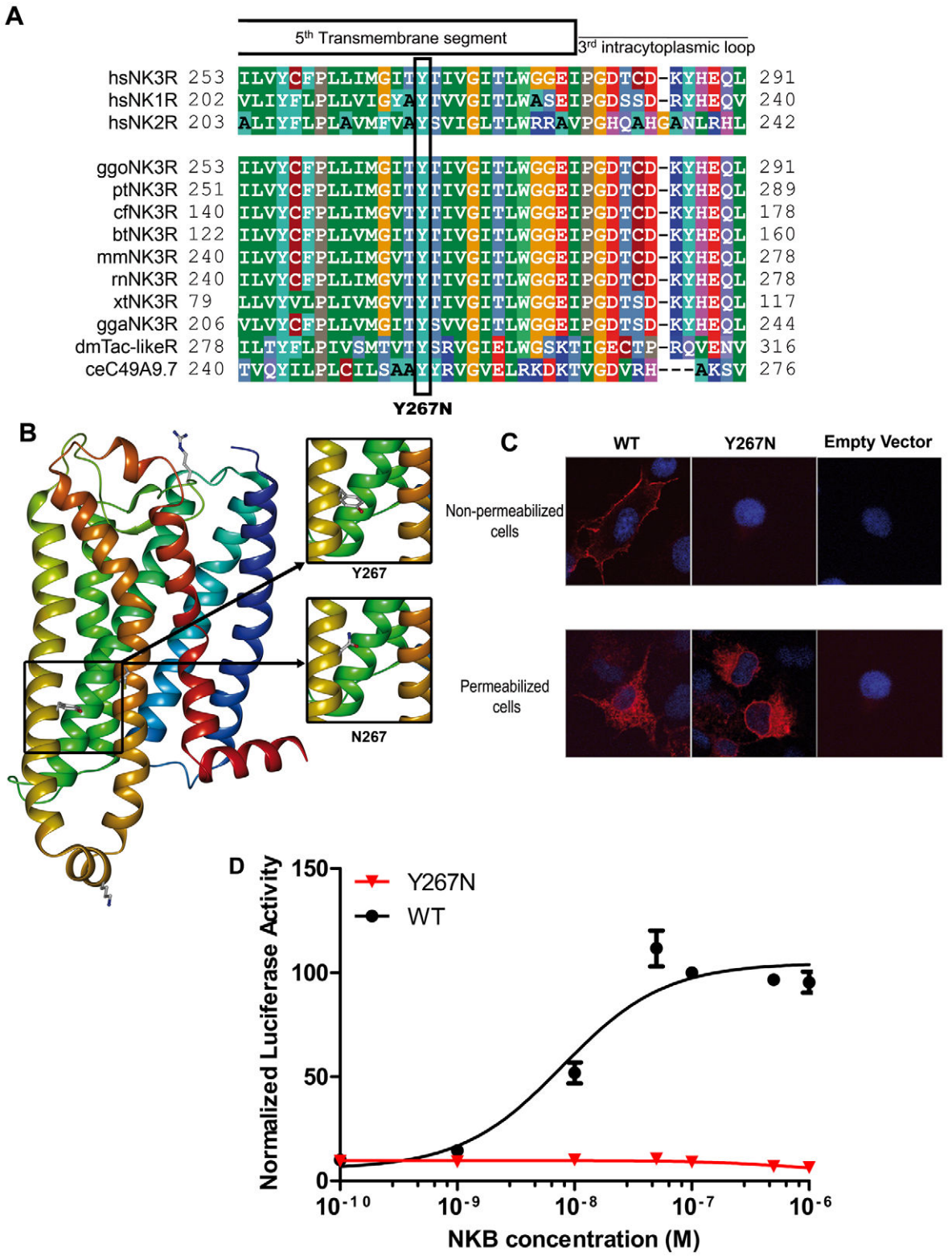


Figure 2. Molecular characterization, functional consequences and modeling of the p.Tyr267Asn *TACR3* mutation. Panel A. Evolutionary conservation of Tyr267. Tyr267 is perfectly conserved among NK3R orthologs and paralogs. The substitution is indicated below. Panel B. Modeling of the transmembrane region of NK3R. The tyrosine 267 and its substitution by an asparagine are pointed at the lipid bilayer. This position is extremely unfavorable for a polar residue such as asparagine. Panel C. Subcellular localization of ectopically expressed NK3R and Y267N mutant in non-permeabilized and permeabilized cells. Cells were transfected with the indicated expression vector and then treated for indirect immunofluorescence as described in the Methods section. The nuclei are counterstained by DAPI (blue). Upper panel: Z-stack projection of NK3R distribution in non-permeabilized cells obtained by confocal microscopy. Lower panel: fluorescence micrographs of fixed and permeabilized cells. Note the absence of Y267N NK3R mutant at the membrane (upper) despite its efficient expression in the cell (lower) whereas wild-type NK3R is

localized at the plasma membrane. Panel D. NKB dose response of the reporter luc2P/SRE. Increasing concentrations of NKB led to an increase in the luciferase activity of wild-type NK3R (black circles). The mutant NK3R (red triangles) did not significantly enhance luciferase activity.
doi:10.1371/journal.pone.0025614.g002

hydrophobic Tyr267 residue is located in the middle of the fifth transmembrane segment and points towards the lipid bilayer (Fig. 2B). Introduction of an asparagine residue at position 267 (Y267N mutation) places a polar residue in a highly hydrophobic environment. Thus, it is likely that the asparagine side chain, in order to adopt a buried position, will induce transmembrane reorganization (twist or rotation). Therefore, the Tyr267Asn mutation leads probably to NK3R misfolding and dysfunction.

To test this misfolding hypothesis, we performed immunocytochemical studies in both permeabilized and non permeabilized cells in order to evaluate the subcellular localization of the Tyr267Asn mutant. In non permeabilized cells the wild-type NK3R molecule was located at the membrane (Fig. 2C, upper panel). In contrast, the Tyr267Asn mutant was not detected at the membrane, suggesting defective trafficking [25]. To ascertain that the mutant was efficiently expressed, we performed immunocytochemical experiments in permeabilized cells. In this condition, both wild-type and mutant proteins were detected. Compared to wild-type, the NK3R mutant was localized in the perinuclear region suggesting a misfolding (Fig. 2C, lower panel). Thus, the substitution of Tyr267 by asparagine impaired the proper targeting of the receptor to the cell surface.

To quantify and compare the stimulation effect of neurokinin B on wild-type and mutant NK3R, we performed dose-response curves for SRE luciferase assay in HEK 293T cells. Consistent with immunocytochemical and modeling studies, functional analyses clearly showed that mutated NK3R failed to stimulate a p44/42 MAP-sensitive SRE reporter gene contrary to the wild-type receptor which showed a clear dose-response stimulation in the presence of neurokinin B (Fig. 2D).

Similar modeling and functional studies were performed to characterize separately the 3 other variants (Lys286Arg, Met306Ile and Arg230His). In addition, the two Lys286Arg and Met306Ile mutations located on the same chromosome were assessed as double mutant. These analyses, detailed in supporting information (Fig. S3 and Fig. S4), suggest that in fact these variants did not affect the structure and the function of NK3R. Therefore they can not be considered as causative of the disease. For that reason, clinical features of these propositi were not detailed here.

Analysis of free alpha subunit (FAS) and gonadotropin pulsatility in nCHH patients with biallelic *TAC3* or *TACR3* mutations

Serum FAS pulsatility was analyzed in subject II.6 from family 1 (Fig. 1A and Table 2), who harbored a homozygous mutation in *TACR3*, and in two subjects partially described elsewhere [3] with either a homozygous *TAC3* or a homozygous *TACR3* mutation. Endogenous serum FAS levels are shown for two of these subjects in Fig. 3A and 3B.

Mean (±SD) basal FAS concentrations in these 3 patients were low (0.19±0.05 IU/L), with a low mean pulse frequency (1.2±1.3 pulses every four hours (mean±SD); normal range: 2.3–3.0) and a low amplitude of detected pulses (0.2±0.1 IU/L). As expected, pulsatile GnRH administration to these 3 nCHH patients significantly ($p<0.01$) increased mean FAS levels (1.1±0.19 IU/L) and the FAS pulse frequency (3.3±0.6 pulses every four hours) and amplitude (0.41±0.11 IU/L, $P<0.05$), in line with GnRH dependency of pituitary FAS secretion [23].

Analysis of basal LH and FSH secretion overnight at 10-min intervals for 4 h in subject II.6 from family 1 (Fig. 1A and Table 2) showed very low levels and a nonpulsatile pattern of LH secretion, whereas mean baseline FSH levels were significantly higher (Fig. 3C). On day 13 of pulsatile GnRH administration (90 ng/kg/pulse, every 90 min, sc), pulses of LH were detected, synchronously with the GnRH boluses (Fig. 3D) and concomitantly with an increase in serum estradiol and inhibin B levels and a slight serum FSH decrease.

Table 2. Characteristics of nCHH patients with biallelic *TACR3* or *TAC3* deleterious mutations selected for FSH/LH ratio calculation.

Cases	Age	FSH/LH Ratio	Sex	Gene	Nucleotides change	References
1*	24	74.0	Female	***TACR3***	c.[483_499del]+[483_499del]	Subject II-5 Family 1 present study
2*	21	43.0	Female	***TACR3***	c.[483_499del]+[483_499del]	Subject II-6 Family 1 present study
3*	19	28.7	Female	***TACR3***	c.[483_499del]+[483_499del]	Subject II-8 Family 1 present study
4	19	27.5	Male	***TACR3***	c.[824 G>A]+[1003 C>T]	Subject II-1 Family 2 present study
5	18	8.6	Male	***TACR3***	c.[799 T>A]+[824 G>A]	Subject II-1 Family 3 present study
6**	28	8.0	Male	***TACR3***	c.[738-1 G>A]+[738-1 G>A]	Subject II-1 Family 4 in ref. 3
7**	26	10.5	Female	***TACR3***	c.[738-1 G>A]+[738-1 G>A]	Subject II-5 Family 4 in ref. 3
8**	23	13.0	Female	***TACR3***	c.[738-1 G>A]+[738-1 G>A]	Subject II-7 Family 4 in ref. 3
9	31	32.0	Male	***TAC3***	c.[209-1 G>C]+[209-1 G>C]	Subject II-1 Family 1 in ref. 3
10	21	39.0	Male	***TAC3***	c.[209-1 G>C]+[209-1 G>C]	Subject II-1 Family 2 in ref. 3
11	26	6,6	Female	***TAC3***	c.[209-1 G>C]+[209-1 G>C]	Subject II-1 Family 3 in ref. 3

*members of the same kindred.
**members of the same kindred.
doi:10.1371/journal.pone.0025614.t002

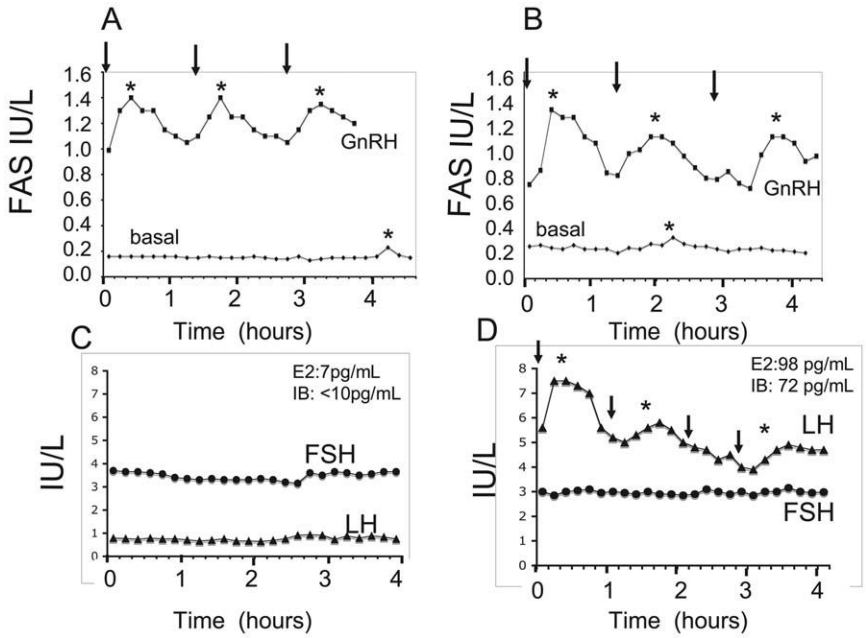


Figure 3. Secretory free alpha-subunit (FAS) and gonadotropin responses to pulsatile GnRH administration. Panel A. FAS concentrations in a man with nCHH caused by a homozygous *TAC3* c.209-1G>C mutation, before and on day 19 of pulsatile GnRH administration (patient reported in part in [3]). Arrows indicate exogenous GnRH boluses (7 µg). Panel B. FAS concentration in a woman with nCHH caused by a mutation in *TACR3* (subject II-6 in family I, Fig. 1A), before and on day 13 of pulsatile GnRH administration. Arrows indicate exogenous GnRH boluses (5 µg). Asterixes denote detectable FAS pulses, using Thomas' algorithm [24]. See *Patients* and *Methods* for details. Panel C. Pattern of gonadotropin secretion in a woman with complete nCHH and *TACR3* mutation (subject II-6 in family I, Fig. 1A). Basal LH concentration was very low and FSH concentration was in the normal range. Panel D. LH pulsatility in this woman was restored by pulsatile GnRH administration, and the serum FSH level fell slightly during pulsatile GnRH administration. Serum estradiol (E2) and inhibin B (IB) levels before and after GnRH administration are indicated respectively at the top of panel C and D.
doi:10.1371/journal.pone.0025614.g003

Serum FSH/serum LH ratio in patients with *TAC3/TACR3* mutations

The FSH/LH ratios in 11 subjects with biallelic *TAC3/TACR3* mutations (Table 2) are shown in Fig. 4A. Compared to subjects with other known genetic causes of nCHH *KISS1R (*mean *(±SD)* FSH/LH = *3.2±2.4*), *GNRHR* (mean FSH/LH = 1.3±0.5) mutations or Kallmann syndrome (*KAL1*:mean FSH/LH = 1.2±0.6), *FGFR1* (mean FSH/LH = 1.5±0.5) and *PROK2* or *PROKR2* mutations (mean FSH/LH = 1.7±1.4)(Information S1) and to 32 patients with nCHH (mean FSH/LH = 1.2±0.8) and no identified genetic anomalies, patients with *TAC3/TACR3* mutations had very significantly ($p<0.001$ for each comparison, see Fig. 4A) higher FSH/LH ratios (mean FSH/LH = 23.6±22.4). Finally, we observed a decline in the FSH/LH ratio in the three subjects (patient II-6 family 1 and in the two nCHH subjects with respectively *TAC3* and *TACR3* mutations in part reported in ref 3) who received pulsatile GnRH administration (from 18.4±17.9 to 0.8±0.2)(Fig. 4B).

Discussion

We found here *TAC3/TACR3* mutations in 5.2% of our nCHH population, a prevalence similar to that described by Gianetti et al [4] in a population of Caucasians, Asians and African-Americans. In this series, all the subjects with nCHH and biallelic *TAC3/TACR3* mutations were born to healthy heterozygous parents. This reinforces the autosomal recessive transmission of these two genetic forms of nCHH, as reported by Topaloglu et al. and us [1–3].

In the first family, we identified a new homozygous mutation in *TACR3* that leads to a frameshift and truncation of the receptor after the third transmembrane domain and therefore almost certainly has a deleterious effect. In two french families of Caucasian origin we found three *TACR3* mutations with compound heterozygous status. They share the same mutation, which generates a stop codon (Trp275stop) and leads to truncation of the protein after the fifth transmembrane domain, indicating that it is also certainly deleterious. This recurrent mutation has been found in the homozygous state in Caucasian American patients with nCHH [4], suggesting either a founder effect in this population or a mutation hotspot in this genomic region. The propositus of the second family also carried on the other allele a novel non sens mutation (Gln335stop) which leads to truncation of the protein after the third extra cellular loop also indicating that it is certainly deleterious. The propositus of the third family also carried a new missense mutation, Tyr267Asn, on the other allele, as revealed by studies of the parents. This mutation, affecting a conserved amino acid in the fifth transmembrane domain, affects the conformation of this domain, as shown by molecular modeling. The deleterious nature of this variant was confirmed by functional analyses showing altered MAP kinase-mediated NK3R signaling. This dysfunction is likely due to receptor misfolding and to defective plasma membrane targeting, as shown by immunocytochemical studies. Such a mechanism has already been reported for mutations affecting another 7-transmembrane-domain receptor (GnRHR) and leading to nCHH [25].

Analysis of gonadotropin concentrations in patients with biallelic *TAC3/TACR3* mutations showed very weak and apulsatile LH secretion, contrasting with preserved FSH concentrations. This profile, already found in other nCHH patients with biallelic *TAC3/TACR3* mutations [1,3], points to the existence of low-frequency (and probably low amplitude) endogenous GnRH

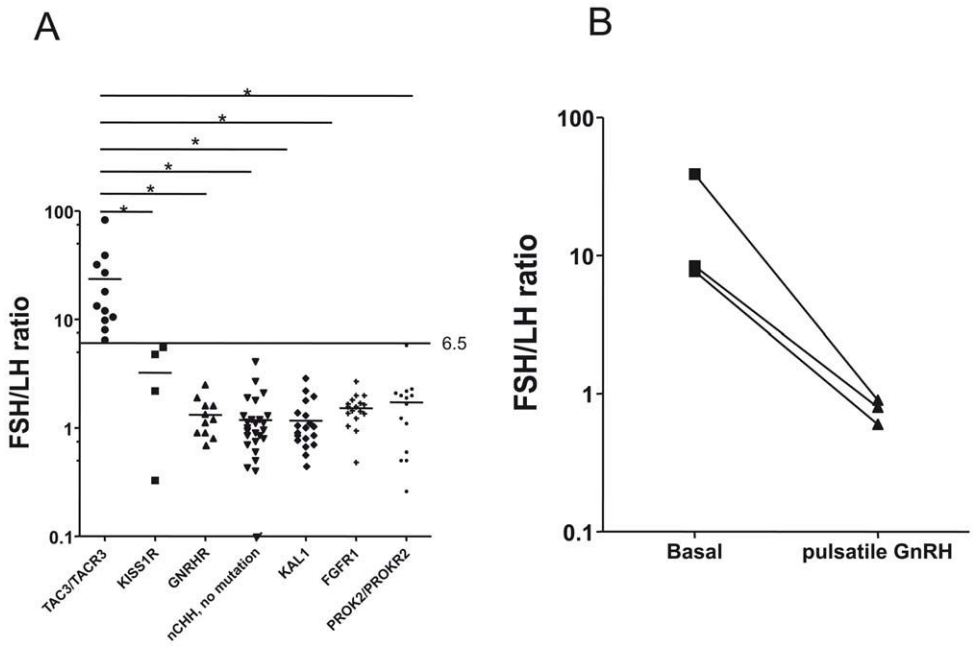


Figure 4. FSH/LH ratio in 11 patients with nCHH caused by biallelic *TAC3/TACR3* mutations. Panel A. Significantly higher serum FSH/ serum LH ratios in 11 patients with nCHH caused by *TAC3/TACR3* biallelic mutations than in patients with other genetic forms of CHH or in CHH patients with no mutation found in known genes. Note the Log scale on Y axis. A whole variance analysis by Kruskal-Wallis test ($p<0.0001$) was performed followed by post-hoc Newman-Keuls multiple comparison test; *indicates a significant difference between 2 groups ($p<0.001$). The threshold separating FSH/LH ratio in *TAC3/TACR3* mutated nCHH subjects from those of patients with other genetic forms of CHH is indicated by an horizontal line. Panel B. Decrease in the FSH/LH ratio in one patient with *TAC3* and two patients with *TACR3* mutations (see *Patients*) during pulsatile GnRH administration. Note the Log scale on Y axis.
doi:10.1371/journal.pone.0025614.g004

secretion [3]. We actually observed slow FAS secretion in all three patients studied, strongly supporting this hypothesis. Moreover, pulsatile GnRH administration at a physiological frequency re-established pulsatile LH and FAS secretion, and decreased the FSH/LH ratio. These pattern of response to pulsatile GnRH treatment are different from those reported in hypothalamic CHH patients, where GnRH leads to a rise in FSH, sometimes to supraphysiologic levels [26], further underlining the originality of the *TAC3/TACR3* mutated nCHH patients' neuroendocrine phenotype. All these data strongly suggest that the gonadotrope deficiency in subjects with *TAC3/TACR3* mutations is linked to a slowing of the frequency of endogenous GnRH secretion. It is therefore likely that neurokinin B, via its receptor NK3R, acts on the hypothalamus to regulate, either directly or indirectly (via kisspeptin/dynorphin/NKB neurons)[10,13], the frequency of GnRH release into the hypothalamo-pituitary portal system. Our hypothesis is in line with a model recently proposed [10,16] whereby kisspeptin, Dyn, and NKB act autosynaptically on kisspeptin neurons in the Arc to shape the pulsatile secretion of kisspeptin and hence GnRH release.

The molecular mechanisms by which low pattern of pulsatile GnRH secretion into portal blood favors FSH secretion by gonadotrope cells remain to be established. In contrast to the LHβ subunit gene, it has been shown in vitro that FSHβ subunit transcription is preferentially stimulated at low rather than high frequencies of pulsatile GnRH [27]. Because the synthesis of FSHβ is the rate-limiting step in FSH production, how FSHβ transcription is regulated is key to understanding the control of FSH release. In the context of the rFSHβ promoter, Ciconne et al. had recently established that GnRH stimulates transcription by increasing bound histone modifying enzyme CBP [28]. This increase in CBP is mediated in turn through the transcription factor CREB, bound to the FSH β CRE site. These authors also showed that mutation of this CRE site abolishes preferential FSH β transcription at low GnRH pulse frequency, implicating this site as an important mediator of GnRH pulse frequency-dependent FSH β gene expression [28].

The existence of a high FSH/LH ratio prior to any treatment in a significant number of patients with biallelic *TAC3/TACR3* mutations, contrary to patients with other genetic causes of CHH, suggests that this ratio could serve as a diagnostic marker to prescreen for *TAC3/TACR3* mutations in untreated patients with nCHH. This would narrow down the number of subjects in whom sequencing is necessary and would thus reduce the cost of genetic studies in this setting, although larger studies will be necessary before recommending this diagnostic approach.

All 11 patients with biallelic *TAC3/TACR3* mutations that we have analyzed to date had nCHH persisting into adulthood (from 18 yrs-old to 46 yrs-old). These results, in keeping with data reported by Topaloglu et al. [1], Guran et al. [2] and Fukami et al. [5], indicate that NKB and its receptor NK3R are crucial for physiological GnRH secretion after puberty, and not only during fetal life as suggested by Gianetti et al. [4]. Furthermore only one documented case of reversible nCHH in patients with *TAC3* biallelic mutations have been reported to date [4], indicating that this phenomenon does not predominate in this genetic form of CHH.

In conclusion, *TAC3/TACR3* mutations are an important genetic cause of nCHH that should be particularly searched in patients with a high serum FSH/LH ratio. Patients with nCHH and biallelic *TAC3/TACR3* mutations represent a useful model for deciphering the physiological role of NKB and its receptor NK3R in the gonadotrope axis. Such human models are all the more important as there is currently no genetic murine model with

which to explore the precise consequences of this signaling dysfunction for hypothalamic GnRH secretion.

Methods

All the participants gave their written informed consent for hormonal exploration and genetic analyses, in keeping with the provisions of the French Bioethics Law and the Declaration of Helsinki and after approval by the Bicêtre Hospital ethic committee (Comité de protection des personnes Ile de France, Hôpital Bicêtre).

Hormone assays

We measured serum levels of LH, FSH, inhibin B, testosterone and estradiol levels with immunoradiometric assay, enzyme-linked immunosorbent assay, or radioimmunoassay, respectively, as previously reported [29,30]. The detection limits of the LH and FSH assays were respectively 0.15 IU/L and 0.2 IU/L. The intra- and interassay coefficients of variation were, respectively, 1.5 and 5.2% for LH, 2.7 and 5.5% for FSH. Endogenous luteinizing hormone and alpha-subunit secretion, analyzed with Thomas' algorithm, was evaluated overnight at 10-minutes intervals, as reported elsewhere [29,30,31]. Serum free alpha-subunit (FAS) levels were measured as previously reported [32], using an immunoradiometric assay (IRMA) with two monoclonal antibodies (Immunotech, Marseille, France). Cross-reactivity of this immunoassay is less than 0.1% for dimeric hormones (including CG, LH, FSH, and TSH) and 0% for the free β-subunits of these hormones. Results are expressed as international units per liter (IU/L) of Medical Research Council 75/569, and the detection limit is 0.025 IU/L. Within-run and between-run coefficients of variation are respectively 6% and 12% at a concentration of 0.3 IU/L, and 3% and 5% at a concentration of 2 IU/L. Normal basal FAS levels are 0.9–1.9 IU/L for postmenopausal women, 0–0.6 IU/L for premenopausal women during the early follicular phase, and 0–0.3 IU/L for men.

For FSH/LH ratio determination, we used blood samples drawn at diagnosis from untreated CHH patients referred to the Endocrinology and Reproductive Diseases department of Hôpital Bicêtre and sera stored at −80°C. All gonadotropin assays were performed in a single run in order to avoid interassay variations.

DNA analysis

Genomic DNA was extracted from white blood cells by using standard procedures.

TAC3 coding exons 2, 3, 4, 5 and 6 and intron-exon junctions and *TACR3* coding exons 1, 2, 3, 4 and 5 and intron-exon junctions were amplified by PCR and sequenced as previously described [1,3]. Sequence variations were found on both strands and confirmed in a separate PCR.

GNRHR, GNRH1, KISS1R, KISS1, KAL1, FGFR1 and *PROK2/PROR2* were also analyzed as previously described, with minor modifications [29–31,33–36].

Modeling studies

The model of NK3R was generated by homology, using as template the crystal structure of rhodopsin, a hepta-transmembrane protein, with the Modeller package (version 9.8) [37]. Loops differing in length between NK3R and rhodopsin were reconstructed using the structural proteins bank (rotamer library) included in the O package [38]. NK3R mutants were generated using the same package. Statistics, calculated with Procheck, showed that >98.6% of the residues in the Ramachandran plot are in the most favored or allowed regions and that side-chain stereo parameters are inside the range or better than the statistics derived from a set of crystal structures of at least 2.0 Å resolution. In addition, the PROSAII program gave a combined Z-score (Cβ and surface potentials) of −3.34, a value in the range of structured proteins. These results suggest that the protein is of good quality and suitable for analysis.

Directed mutagenesis

NK3R mutants were reproduced by site-directed mutagenesis using the pcDNA3.1+ plasmid encoding human NK3R with an hemagglutinin (HA) tag localized on the extracellular NK3R N-terminal extremity (Missouri S&T cDNA Resource Center) with the QuickChange Stratagen II kit (Stratagene, La Jolla, CA). Clones were verified by sequencing.

Luciferase reporter gene assays

Tachykinin G protein-coupled receptors signal through several second messenger pathways including phosphoinositide and MAP kinase pathways (ERK 1/2) [39]. We thus used the luc2P/SRE/Hygro plasmid (Promega) which can induce luciferase production in response to MAP kinase activation as a reporter gene system [40]. HEK 293T cells (12,000 cells/well) were seeded 72 h before testing in high-glucose Dulbecco's minimal essential medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) containing 2 mM glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 10% heat-inactivated fetal calf serum at 37°C in 96-well plates. Twenty-four hours before testing, the cells were cotransfected in serum free OptiMEM, using Lipofectamine 2000 as recommended by the manufacturer (Invitrogen) with the plasmids coding for the wild-type or NK3R mutants, the luc2P/SRE/Hygro plasmid (Promega) and pRSV-beta-galactosidase plasmid. On the test day, neurokinin B was added at seven dilutions (from 10^{-10} to 10^{-6} M) to the culture medium. After incubation for 5–6 h the cells were harvested and assayed for β-galactosidase and luciferase activities as previously described [41], using a luminometer (Victor, Perkin Elmer). To standardize the transfection efficiency, the relative light units obtained in the luciferase assay were divided by the optical density obtained in the β-galactosidase assay. Maximum activity was considered at $5x10^{-7}$ M NKB. Prism version 3.02 (GraphPad Software Inc., SanDiego, CA) was used for curve fitting from at least three independent experiments performed in triplicate. Results are expressed as mean±SEM.

Immunocytochemistry

COS-7 cells were grown in 24-well plates containing glass coverslips (14-mm diameter). After transfection with the expression vector coding for HA-NK3R, cells were processed as previously described [42]. Briefly, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized for 10 min with a 0.2% solution of Triton X100 diluted in PBS. Cells were then incubated overnight at 4°C with an anti-HA antibody (clone 3F10, Roche Applied Science), followed by an anti-rat fluorochrome-coupled secondary antibody (Dylight 549, Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 30 min. Nuclear counterstaining was performed with 0.5 µg/mL DAPI (4′,6′-diamidino-2-phenylindole). Fluorescent cells were observed with an Olympus Provis AX70. Images were acquired with Qcapture Pro version 5.1 (Q Imaging Inc.). For live cell staining, cells were incubated for 1 h with the anti-HA antibody before fixation with 2% paraformaldehyde and direct incubation with the Dylight 549 secondary antibody. After extensive washing with TBS-Tween (0.1%), cells were post-fixed with 2% paraformaldehyde and counterstained with DAPI, rinsed quickly in water, and then mounted on slides with ProLong Gold mounting medium (Molecular Probes). A Zeiss LSM-510 confocal scanning laser

microscope (Carl Zeiss, Thornwood, NY) was used to acquire Z-series of focal planes using a Plan Apochromat 63 oil objective.

Supporting Information

Figure S1 Schematic representation of the human NK3R variants found in a cohort of 173 normosmic CHH. The mutated residues are indicated by red circles (see also Table 1).
(DOC)

Figure S2 Molecular characterization of biallelic variants. DNA sequencing of the genomic region encompassing the mutation. In-frame amino acids are indicated above each sequence. Panel A: Molecular characterization of the *TACR3* c.483_499 deletion in family 1 (see Fig. 1A). The *TACR3* c.483_499 deletion (delimited by the red vertical line) leads to a frameshift from codon 161 which is responsible for the emergence of a premature stop codon at position 183. This frameshift mutation was homozygous in the affected female propositus (Subject II-6) and heterozygous in her unaffected father (Subject I.1). A wild type homozygous unaffected sister (subject II-1) is indicated in the upper part of the panel. This gene product is 182 amino acids long, compared to 465 aa for the full-length protein. Only 3 transmembrane domains are encoded, rather than the 7 transmembrane domains in the wild-type receptor. Panel B: Molecular characterization of compound heterozygous *TACR3* mutations (c.824G>A and c.1003C>T) in family 2 (see Fig. 1B). The c.824G>A substitution produces a stop codon in the fifth transmembrane domain (p.Trp275stop = W275X) of NK3R. It was found in the heterozygote state in the unaffected father. The c.1003C>T substitution produces a stop codon at the junction between the third extra cellular loop and the seventh transmembrane domain (p.Gln335stop = Q335X) of NK3R. This mutation was found at the heterozygote state in the unaffected mother. Panel C: Molecular characterization of compound heterozygous *TACR3* mutations (c.799T>A and c.824G>A) in family 3 (Fig. 1C). The c.824G>A substitution is the same as in patient II-1 family 2, Fig. 1C. It was found in the heterozygous state in the unaffected father. The c.799T>A substitution produces a missense mutation (p.Tyr267Asn = Y267N) located in the fifth transmembrane domain of NK3R. This mutation was found in the heterozygous state in the unaffected mother.
(DOC)

Figure S3 Molecular characterization, functional consequences and modeling of Lys286Arg and Met306Ile NK3R variants. In propositus II.2 from family 4 (panel A and panel B), we found **two variants (c.857A>G and c.918G>A).** The same variants were found in the unaffected father's (panel A) showing that it was not a real biallelic form. Lys286 is not conserved in the three human tachykinin receptors but is highly conserved in all NK3R orthologs (panel C). Using the three-dimensional model we found that Lys286 (K286) is located in the third intracellular loop (panel D)(see also Fig. S1). We tested the activity of the mutant receptor on the SRE luc reporter gene (panel E (upper)) and showed that there was no meaningful difference between the p.Lys286Arg mutant (green squares) and the wild-type NK3R (black circles). The c.918G>A produces a missense mutation (p.Met306Ile) located in the sixth transmembrane segment of NK3R (Fig. S1). It is poorly conserved in the three human tachykinin receptors and NK3R orthologs (panel C). Using the three-dimensional model, we found that Met306 (M306) is located at the middle of the sixth transmembrane segment and fully surface exposed (panel D). We tested the activity of the p.Met306Ile variant on the SRE-Luc reporter gene system (panel E (middle)) and showed that there was no difference between the p.Met306Ile mutant (green triangles) and the wild-type NK3R (black circles). To verify that the p.Lys286Arg variant did not interfere with the function of the p.Met306Ile mutant we performed a double p.Lys286Arg+p.Met306Ile mutant. The activity of the double mutant on the SRE-Luc reporter gene system (orange triangles) was similar to that in the wild-type NK3R (black circles) (panel E (lower)).
(DOC)

Figure S4 Molecular characterization, functional consequences and modeling of Arg230His NK3R variant. In propositus II.1 from family 5 (Panels A and B) we found **one variant (c.689G>A) at the heterozygous state**. This variant, located in the second extracellular loop of NK3R, produces a missense mutation (p.Arg230His)(see also Fig. S1). It is partly conserved in the three human tachykinin receptors and almost completely conserved in NK3R orthologs (Panel C). Using the three-dimensional model, we found that Arg230 (R230) is located in the second extracellular loop and solvent-exposed (Panel D). We tested the activity of the mutant receptor on the SRE-Luc system (Panel E) and showed that the Arg230His mutation has no consequence on the receptor activity.
(DOC)

Information S1 Mutations in patients with other genetic causes of CHH or Kallmann syndrome included for the analysis of serum FSH/LH ratio (Fig. 4A).
(DOC)

Acknowledgments

We thank Carinne Cogliatti and Isabelle Boucly for their excellent technical assistance, Meriem Messina for plasmid preparation and Philippe Leclerc (I^2B, Institut Biomedical de Bicêtre) for his assistance in confocal microscopy. We thank Dr. Olivier Lascols for providing Reunion island DNA samples.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BF JB AGM JY. Performed the experiments: BF JB AV LA ST JF GM. Analyzed the data: BF JB AGM JY. Contributed reagents/materials/analysis tools: SBT PC PL. Wrote the paper: BF JB AGM JY.

References

1. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, et al. (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.
2. Guran T, Tolhurst G, Bereket A, Rocha N, Porter K, et al. (2009) Hypogonadotropic hypogonadism due to a novel missense mutation in the first extracellular loop of the neurokinin B receptor. J Clin Endocrinol Metab 94: 3633–3639.
3. Young J, Bouligand J, Francou B, Raffin-Sanson ML, Gaillez S, et al. (2010) TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. J Clin Endocrinol Metab 95: 2287–2295.
4. Gianetti E, Tusset C, Noel SD, Au MG, Dwyer AA, et al. (2010) TAC3/TACR3 Mutations Reveal Preferential Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone Release by Neurokinin B in Neonatal Life Followed by Reversal in Adulthood. J Clin Endocrinol Metab 95: 2857–2867.
5. Fukami M, Maruyama T, Dateki S, Sato N, Yoshimura Y, et al. (2010) Hypothalamic Dysfunction in a Female with Isolated Hypogonadotropic Hypogonadism and Compound Heterozygous TACR3 Mutations and Clinical Manifestation in Her Heterozygous Mother. Horm Res Paediatr 73(6): 477–481.
6. Latronico AC (2009) The neurokinin B pathway in human reproduction. Nat Genet 41: 269–270.
7. Burke MC, Letts PA, Krajewski SJ, Rance NE (2006) Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. J Comp Neurol 498: 712–726.

8. Amstalden M, Coolen LM, Hemmerle AM, Billings HJ, Connors JM, et al. (2010) Neurokinin 3 receptor immunoreactivity in the septal region, preoptic area and hypothalamus of the female sheep: colocalisation in neurokinin B cells of the arcuate nucleus but not in gonadotrophin-releasing hormone neurones. J Neuroendocrinol 22: 1–12.
9. Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV, et al. (2007) Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. Endocrinology 148: 5752–5760.
10. Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, et al. (2010) Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of thearcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. J Neurosci 30: 3124–3132.
11. Ramaswamy S, Seminara SB, Ali B, Ciofi P, Amin NA, et al. (2010) Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (Macaca mulatta) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus. Endocrinology 151: 4494–4503.
12. Duarte CR, Schutz B, Zimmer A (2006) Incongruent pattern of neurokinin B expression in rat and mouse brains. Cell Tissue Res 323: 43–51.
13. Rance NE, Krajewski SJ, Smith MA, Cholanian M, Dacks PA (2010) Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. Brain Res 1364: 116–128.
14. Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, Guerriero KA, Morgan K, et al. (2009) Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. J Neurosci 29: 3920–3929.
15. Sandoval-Guzman T, Rance NE (2004) Central injection of senktide, an NK3 receptor agonist, or neuropeptide Y inhibits LH secretion and induces different patterns of Fos expression in the rat hypothalamus. Brain Res 1026: 307–312.
16. Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, et al. (2009) Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. J Neurosci 29: 11859–11866.
17. Corander MP, Challis BG, Thompson EL, Jovanovic Z, Loraine Tung YC, et al. (2010) The effects of neurokinin B upon gonadotrophin release in male rodents. J Neuroendocrinol 22: 181–187.
18. Navarro VM, Castellano JM, McConkey SM, Pineda R, Ruiz-Pino F, et al. (2010) Interactions between kisspeptin and neurokinin B, in the control of GnRH secretion in the female rat. Am J Physiol Endocrinol Metba 300: E202–E210, 2011.
19. Siuciak JA, McCarthy SA, Martin AN, Chapin DS, Stock J, et al. (2007) Disruption of the neurokinin-3 receptor (NK3) in mice leads to cognitive deficits. Psychopharmacology (Berl) 194: 185–195.
20. Brioude F, Bouligand J, Trabado S, Francou B, Salenave S, et al. (2010) Non-syndromic congenital hypogonadotropic hypogonadism: clinical presentation and genotype-phenotype relationships. Eur J Endocrinol 162: 835–851.
21. Winters SJ, Troen P (1988) Alpha-subunit secretion in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab 66: 338–342.
22. Whitcomb RW, O'Dea LS, Finkelstein JS, Heavern DM, Crowley WF Jr. (1990) Utility of free alpha-subunit as an alternative neuroendocrine marker of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) stimulation of the gonadotroph in the human: evidence from normal and GnRH-deficient men. J Clin Endocrinol Metab 70: 1654–1661.
23. Crowley WF, Taylor AE, Martin KA, Whitcomb RC, Finkelstein JS, et al. (1994) Use of the free alpha subunit (FAS) of glycoprotein secreting hormones as a surrogate marker of GnRH secretion in the human. In: Lustbader JW PD, Ruddon RW, eds. Glycoprotein hormones: structure, function, and clinical implications. New York: Springer-Verlag. pp 253–263.
24. De Luca F, Mitchell V, Wasniewska M, Arrigo T, Messina MF, et al. (2008) Regulation of spermatogenesis in McCune-Albright syndrome: lessons from a 15-year follow-up. Eur J Endocrinol 158: 921–927.
25. Conn PM, Janovick JA (2009) Trafficking and quality control of the gonadotropin releasing hormone receptor in health and disease. Mol Cell Endocrinol 299: 137–145.
26. Pitteloud N, Hayes FJ, Dwyer A, Boepple PA, Lee H, et al. (2002) Predictors of outcome of long-term GnRH therapy in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab 87: 4128–4136.
27. Ciccone NA, Kaiser UB (2009) The biology of gonadotroph regulation. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 16: 321–327.
28. Ciccone NA, Xu S, Lacza CT, Carroll RS, Kaiser UB (2010) Frequency-dependent regulation of follicle-stimulating hormone beta by pulsatile gonadotropin-releasing hormone is mediated by functional antagonism of bZIP transcription factors. Mol Cell Biol 30: 1028–1040.
29. Salenave S, Chanson P, Bry H, Pugeat M, Cabrol S, et al. (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.
30. Bouligand J, Ghervan C, Tello JA, Brailly-Tabard S, Salenave S, et al. (2009) Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. N Engl J Med 360: 2742–2748.
31. de Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, Chanson P, et al. (1997) A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. N Engl J Med 337: 1597–1602.
32. Chanson P, Pantel J, Young J, Couzinet B, Bidart JM, et al. (1997) Free luteinizing-hormone beta-subunit in normal subjects and patients with pituitary adenomas. J Clin Endocrinol Metab 82: 1397–1402.
33. Dode C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Du N, et al. (2003) Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. Nat Genet 33: 463–465.
34. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, et al. (2003) Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 10972–10976.
35. Dode C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, et al. (2006) Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. PLoS Genet 2: e175.
36. Luan X, Zhou Y, Wang W, Yu H, Li P, et al. (2007) Association study of the polymorphisms in the KISS1 gene with central precocious puberty in Chinese girls. Eur J Endocrinol 157: 113–118.
37. Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, et al. (2006) Comparative protein structure modeling using Modeller. Curr Protoc Bioinformatics 50: 2.9.1–2.9.31.
38. Jones TA, Zou JY, Cowan SW, Kjeldgaard M (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. Acta Crystallogr A 47(Pt 2): 110–119.
39. Schmidlin F, Roosterman D, Bunnett NW (2003) The third intracellular loop and carboxyl tail of neurokinin 1 and 3 receptors determine interactions with beta-arrestins. Am J Physiol Cell Physiol 285: C945–958.
40. Goze C, Berge G, M'Kadmi C, Floquet N, Gagne D, et al. (2010) Involvement of tryptophan W276 and of two surrounding amino acid residues in the high constitutive activity of the ghrelin receptor GHS-R1a. Eur J Pharmacol 643: 153–161.
41. Pascual-Le Tallec L, Kirsh O, Lecomte MC, Viengchareun S, Zennaro MC, et al. (2003) Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 1 interacts with the N-terminal domain of mineralocorticoid receptor and represses its transcriptional activity: implication of small ubiquitin-related modifier 1 modification. Mol Endocrinol 17: 2529–2542.
42. Amazit L, Pasini L, Szafran AT, Berno V, Wu RC, et al. (2007) Regulation of SRC-3 intercompartmental dynamics by estrogen receptor and phosphorylation. Mol Cell Biol 27: 6913–6932.

Conclusion de l'article *Francou et al. PLoS One 2011*

Les patients nCHH mutés pour *TAC3/TACR3* ont un profil neuroendocrinien particulier.

Nous retrouvons dans cette série une fréquence de mutations de 5.2 % très similaire à celle préalablement publiée [75]. En revanche les patients ayant un CHH décrits dans notre étude sont tous normosmiques et biallèliques contrairement à la série de Gianetti et al. qui comportait à la fois des formes hyposmiques et normosmiques et où seulement neuf cas index sur les vingt étaient biallèliques. Dans notre série, les sujets portant un variant monoallèlique dans les familles ne sont pas affectés de CHH. De plus, nous ne retrouvons pas de cas de réversibilité du phénotype de CHH observé par Gianetti et al. en dépit d'un suivi jusqu'à des âges adultes avancés.

La caractérisation fonctionnelle réalisée a permis de classer trois variants rares de *TACR3* comme des polymorphismes sans lien avec le phénotype de CHH et d'affirmer l'implication de cinq autres variants dans le phénotype.

L'analyse des profils de sécrétion de la GnRH (par l'analyse de la sécrétion de la sous unité alpha libre FAS des gonadotrophines) montre une pulsatilité très ralentie avec des pics de faible intensité. En regard de cette sécrétion de la sous-unité alpha, la sécrétion de la LH est de très faible amplitude et apulsatile contrairement à la sécrétion de la FSH qui est, elle préservée. Ce résultat laisse donc supposer une sécrétion endogène de GnRH, insuffisante pour entrainer la sécrétion de LH de façon forte et pulsatile mais permettant la sécrétion de FSH chez les patients nCHH avec mutations biallèliques de la voie de la Neurokinine B.

L'injection par bolus de GnRH à une fréquence proche de la physiologie permet de restaurer la sécrétion de LH à la fois en amplitude et en fréquence. Le rapport FSH/LH initialement élevé retourne vers la valeur de 1. La stimulation des stéroïdes sexuels est également rétablie.

L'étude des rapports FSH/LH de l'ensemble des patients ayant un CHH de cause génétique identifiée (mutations de *KISS1R, GNRHR, KAL1, FGFR1, PROK2/PROKR2*) ou sans mutations identifiées montre que l'élévation du rapport FSH/LH est propre aux patients mutés sur les gènes *TAC3* et *TACR3*. Ceci pourrait constituer un marqueur diagnostique pour orienter les analyses génétiques chez les patients atteints de nCHH.

En conclusion, nos résultats démontrent un profil neuroendocrinien particulier des patients atteints de CHH en lien avec une altération de la voie de signalisation de la Neurokinine B et de son récepteur NK3R. Les mutations perte de fonction à l'état biallèlique des gènes *TAC3/TACR3* entrainent un ralentissement et une diminution de la sécrétion pulsatile de GnRH. La voie de signalisation de la Neurokinine B serait donc d'action hypothalamique et régulerait le rythme de sécrétion de GnRH dans le système porte hypothalamo-hypophysaire.

Chez ces patients mutés *TAC3/TACR3*, la possible réversibilité décrite par Gianetti et al. après traitement et la préservation de la sécrétion de la FSH suggèrent une profondeur du déficit en GnRH et un phénotype de CHH moins marqué que pour les patients mutés pour *KISS1R.*

Test Clinique d'utilisation de la Kisspeptine chez des patients mutés pour la voie de la Neurokinine B

Article *Young et al. Neuroendocrinology 2013*

Rapid Communication

Neuro-endocrinology

Neuroendocrinology 2013;97:193–202
DOI: 10.1159/000336376

Received: Oc
Accepted aft
Published or

Kisspeptin Restores Pulsatile LH Secretion in Patients with Neurokinin B Signaling Deficiencies: Physiological, Pathophysiological and Therapeutic Implications

Jacques Young[a–c] Jyothis T. George[e] Javier A. Tello[e, f] Bruno Francou[a, b, d]
Jerome Bouligand[a, b, d] Anne Guiochon-Mantel[a, b, d] Sylvie Brailly-Tabard[a, b, d]
Richard A. Anderson[e] Robert P. Millar[e–g]

Introduction de l'article *Young et al. Neuroendocrinology 2013*

L'administration de Kisspeptine restaure la sécrétion pulsatile de LH chez les patients atteints de nCHH en l'absence de signalisation de la Neurokinine B.

Les travaux précédents analysant des patients mutés pour les gènes *TAC3/TACR3* ont mis en lumière le rôle de la voie de signalisation de la Neurokinine B sur le contrôle de la sécrétion pulsatile de la GnRH en ralentissant la fréquence et diminuant l'amplitude de ces "pulses". La sécrétion de LH était dans ce cas effondrée et celle de FSH préservée [172,173].

Parallèlement la découverte des mutations de *KISS1R* et *KISS1* ont mis en évidence le rôle de cette voie de signalisation dans le déclenchement de la puberté chez le rongeur et chez l'homme. Chez l'homme les sécrétions de LH et de FSH étaient toutes deux basses [162,174]. L'administration d'antagoniste de la Kisspeptine chez le rat provoquait un ralentissement de la pulsatilité de la LH [175] alors que chez l'homme, l'administration de la Kisspeptine augmentait la fréquence des pics de LH [176].

Les neurones co-exprimant les Kisspeptines et la Neurokinine B (KNDy cells) sont situés dans le noyau arqué de l'hypothalamus chez le rat, la souris, le mouton, la chèvre et quelques éléments suggèrent que cela est également le cas chez l'homme. Ces neurones sont également en contact chez nombre de ces espèces avec les neurones sécrétant la GnRH dans l'hypothalamus médiobasal et l'aire préoptique [78,85]. Ils expriment de plus des récepteurs aux stéroïdes (œstradiol et glucocorticoïdes) et à la leptine, expressions mises en évidence individuellement chez une ou plusieurs des espèces précédemment citées. Ces résultats suggèrent que les KNDy cells pourraient faire partie d'un nœud central d'intégration de différents signaux connus régulateurs de la sécrétion de la GnRH (rétrocontrôles par les stéroïdes sexuels, stress, état nutritionnel...).

Les neurones à GnRH expriment le récepteur des Kisspeptines mais pas celui de la Neurokinine B. Les neurones KnDy expriment en revanche le récepteur NK3R. Cela permet de faire l'hypothèse que la Neurokinine B sécrétée par les neurones KNDy puisse agir de façon autocrine ou paracrine afin de promouvoir la sécrétion de Kisspeptine. La Kisspeptine agirait alors seule sur le neurone à GnRH et déclencherait la sécrétion pulsatile de GnRH. Afin de tester cette hypothèse, notre travail propose d'administrer de la Kisspeptine en continu à des patients ayant perdu la signalisation de la Neurokinine B par mutations de *TAC3* ou *TACR3* et d'observer une éventuelle restauration de la sécrétion pulsatile de LH.

Rapid Communication

Neuro-endocrinology

Neuroendocrinology 2013;97:193–202
DOI: 10.1159/000336376

Received: October 4, 2011
Accepted after revision: January 5, 2012
Published online: February 24, 2012

Kisspeptin Restores Pulsatile LH Secretion in Patients with Neurokinin B Signaling Deficiencies: Physiological, Pathophysiological and Therapeutic Implications

Jacques Young[a–c] Jyothis T. George[e] Javier A. Tello[e, f] Bruno Francou[a, b, d] Jerome Bouligand[a, b, d] Anne Guiochon-Mantel[a, b, d] Sylvie Brailly-Tabard[a, b, d] Richard A. Anderson[e] Robert P. Millar[e–g]

[a]Faculté de Médecine Paris-Sud UMR-S693, Université Paris-Sud, [b]INSERM U693, IFR93, [c]Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction, and [d]Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France; [e]MRC Human Reproductive Sciences Unit, University of Edinburgh, and [f]Centre for Integrative Physiology, University of Edinburgh, School of Biomedical Sciences, Edinburgh, UK; [g]Mammal Research Institute, University of Pretoria, Pretoria, and UCT/MRC Receptor Biology Unit, University of Cape Town, Cape Town, South Africa

Key Words

Deficient NKB signaling · GnRH pulse generation · Kisspeptin · Kisspeptin-10 infusion · Neurokinin B signaling deficiency · Pulsatile LH secretion · Hypogonadotropic hypogonadism

Abstract

Pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is crucial to normal reproductive function and abnormalities in pulse frequency give rise to reproductive dysfunction. Kisspeptin and neurokinin B (NKB), neuropeptides secreted by the same neuronal population in the ventral hypothalamus, have emerged recently as critical central regulators of GnRH and thus gonadotropin secretion. Patients with mutations resulting in loss of signaling by either of these neuroendocrine peptides fail to advance through puberty but the mechanisms mediating this remain unresolved. We report here that continuous kisspeptin infusion restores gonadotropin pulsatility in patients with loss-of-function mutations in NKB (*TAC3*) or its receptor (*TAC3R*), indicating that kisspeptin on its own is sufficient to stimulate pulsatile GnRH secretion. Moreover, our findings suggest that NKB action is proximal to kisspeptin in the reproductive neuroendocrine cascade regulating GnRH secretion, and may act as an autocrine modulator of kisspeptin secretion. The ability of continuous kisspeptin infusion to induce pulsatile gonadotropin secretion further indicates that GnRH neurons are able to set up pulsatile secretion in the absence of pulsatile exogenous kisspeptin.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

Introduction

The seminal discovery of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) [1] and subsequent studies have categorically established its role as the final neuroendocrine conduit for control of the gonadotropins, luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) by diverse central nervous system inputs [2, 3]. LH and FSH act in concert to stimulate sex steroid secretion and ga-

KARGER

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/nen

© 2012 S. Karger AG, Basel
0028–3835/13/0972–0193$0/0

Karger Open access

This is an Open Access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 License (www.karger.com/OA-license-WT), applicable to the online version of the article only. Distribution for non-commercial purposes only.

Robert P. Millar
Mammal Research Institute, University of Pretoria
Pretoria 0028 (South Africa)
Tel. +27 420 3776
E-Mail robertpetermillar@gmail.com

metogenesis in the testes and ovaries. Appropriate gonadotropin pulse frequency and amplitude is crucial for normal reproduction [2, 4] and disruption is associated with pathological conditions such as hypothalamic amenorrhea (low pulse frequency) [5] and polycystic ovarian syndrome (high pulse frequency) [6]. However, the precise mechanisms whereby inputs such as metabolic status and sex steroids regulate GnRH secretion remained cryptic as GnRH neurons lack requisite receptors, estrogen receptor alpha [7] and leptin [8].

Recent discoveries of naturally occurring mutations have revolutionized our understanding of the neuroendocrine regulation of gonadotropins [2, 9, 10]. The discovery that mutations in the human and rodent G-protein-coupled receptor 54 (GPR54 also referred to as KISS1R) resulted in failure to progress through puberty and achieve adult reproductive function [11, 12] led to the recognition that GPR54 and its cognate ligands, kisspeptins, are required for GnRH release and downstream gonadotropin secretion. The localization of kisspeptins to arcuate nucleus (ARC) neurons [9, 10, 13, 14], and its potential involvement as a component of the GnRH pulse generator [9, 13, 14], suggested a role for kisspeptin in the regulation of GnRH pulse frequency. This postulate is supported by a slowing of LH pulse frequency after kisspeptin antagonist injection into the ARC of rats [15] and an increase in LH pulse frequency after kisspeptin administration in men [16]. Kisspeptin neurons express receptors for sex steroids which modulate kisspeptin gene expression, thereby providing a relay for steroid hormone feedback on GnRH neuron regulation [9, 10, 13, 14].

Kisspeptin neurons in the ARC have been shown to also express neurokinin B (NKB) and dynorphin A (DYN) peptides [13, 14, 17, 18] and are therefore called KNDY neurons [13]. Inactivating mutations in the genes encoding NKB (*TAC3*) and its cognate receptor, NK3R (*TACR3*), have also been recently shown, like GPR54 mutations, to result in hypogonadotropic hypogonadism; characterized by a failure to progress through puberty [19, 20]. In contrast, *TACR3*-inactivating mutation in mice does not result in a phenotype of reproductive deficiency [21, 22].

In order to contribute to an understanding of the hierarchy of roles of kisspeptin and NKB in the neuroendocrine control of GnRH pulsatility, we have administered kisspeptin to patients with hypogonadotropic hypogonadism resulting from naturally occurring loss-of-function mutations in the NKB ligand and its receptor. These patients are characterized by very low LH but normal or near-normal FSH circulating concentrations [19, 20], consistent with low GnRH pulse frequency [23]. In contrast, inactivating mutations in the kisspeptin receptor result in low circulating concentrations of both LH and FSH [11, 12]. Since GnRH neurons express the GPR54 receptor but apparently not NK3R in sheep and mice [18, 24, 25] and kisspeptin (KNDY) neurons express NK3R [26–28], we hypothesized that NKB secreted from KNDY neurons acts in an autocrine or paracrine manner to enhance kisspeptin secretion, and that kisspeptin alone is sufficient to elicit GnRH pulsatility. To test this postulate we infused kisspeptin at a GPR54-saturating concentration in patients with *TAC3*- and *TACR3*-inactivating mutations and demonstrated a restoration of LH pulsatility. This is the first indication of cooperative interactions of neuropeptides within a single neuronal population eliciting a pulsatile output essential for human health, and provides information on the hierarchy of kisspeptin and NKB in regulating GnRH secretion in humans.

Methods

Participants

Patients 1 and 2 were 21- and 31-year-old men harboring the c.209-1G_C homozygous mutation in the NKB gene (*TAC3*) [20]. This mutation is located in the IVS3 acceptor splice-site and unmasks a cryptic splice-site in IVS3, leading to the insertion of 22 nucleotides between exons 3 and 4 in the transcript. This insertion results in a frame-shift downstream of codon 67 and the emergence of a premature stop codon at position 76, causing the termination of translation upstream of the NKB coding region. Patient 3 was a 26-year-old woman with a homozygous deletion (c.483_499del) in the gene encoding NK3R (*TACR3*). This deletion leads to a frame-shift downstream of codon 161 resulting in a premature stop codon at position 183 truncating *TACR3* after the third transmembrane domain.

Patient 4 was a 28-year-old man harboring the homozygous c.738-1G_A mutation in the *TACR3* gene. This results in the loss of the natural splice acceptor site of intron 2 resulting in the truncation of the receptor after the second extracellular loop, thus eliminating transmembrane domains 5–7 and the associated intracellular and extracellular loops [20].

Testosterone enanthate therapy in the 3 male patients and estrogen-progestin replacement therapy in the female patient were discontinued at least 3 months before evaluation.

Protocol

Kisspeptin-10 was custom-synthesized under GMP standards (Bachem GmbH, Weil am Rhein, Germany) and reconstituted in 5 ml sterile physiological saline as previously described [16]. The Paris Sud University and Bicêtre Hospital Ethics Committees approved the study and all participants gave their informed consent. Subjects were admitted to the Bicêtre Hospital at 08:00 h for 12 h of blood sampling every 10 min for 2 consecutive days as previously described [20]. Vehicle (NaCl 0.9%) or kisspeptin-10 (1.5 μg/kg/h was infused intravenously from 08:30 to 20:30 h on days

Table 1. Mean (±SD) serum LH, FSH, inhibin B, testosterone and estradiol concentrations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism caused by NKB (patients 1 and 2) or NK3R (patients 2 and 3) biallelic mutations receiving vehicle (saline) and then kisspeptin-10 (Kp10) infusion

	Patient 1 (male)		Patient 2 (male)		Patient 3 (female)		Patient 4 (male)		Normal range[1]
	saline	Kp10	saline	Kp10	saline	Kp10	saline	Kp10	
LH, IU/l	0.20 ± 0.1	0.40 ± 0.2***	0.62 ± 0.41	1.21 ± 0.60***	0.22 ± 0.06	1.25 ± 0.56***	0.42 ± 0.10	1.12 ± 0.43***	M: 2.6–6.5; F: 4–7.0
FSH, IU/l	2.9 ± 0.2	3.4 ± 0.5***	4.4 ± 0.6	7.1 ± 1.1***	2.1 ± 0.1	4.2 ± 0.9***	3.0 ± 0.2	5.4 ± 0.7***	M: 2.7–7.4; F: 4–7.4
Inhibin B pg/ml	15.9 ± 3.2	27.4 ± 4.6*	10.4 ± 1.6	19.1 ± 3.1*	8.15 ± 2.9	26.2 ± 4.7**	66 ± 7.4	112 ± 13.7**	M: 80–330; F: 60–125
Testosterone ng/ml	0.13 ± 0.1	0.4 ± 0.2*	0.12 ± 0.08	0.6 ± 0.14*	ND	ND	0.42 ± 0.10	1.12 ± 0.43*	M: 3.5–8.5
Estradiol pg/ml	ND	ND	ND	ND	6.4 ± 1.9	18.2 ± 3.1**	ND	ND	F: 25–90

During each treatment, 12 random measurements of inhibin B, testosterone and estradiol were performed. ND = Not determined.
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$ (paired t test). [1] Normal hormonal range in postpubertal males (M) and females (F).

1 and 2, respectively). There were no adverse events related to kisspeptin-10 or vehicle infusions.

Hormone Assays

Serum LH, FSH, inhibin B, testosterone and estradiol levels were measured by immunoassays as previously described [29–32]. The detection limits of the LH and FSH assays were 0.12 and 0.2 IU/l, respectively. The intra- and interassay coefficients of variation were 1.6 and 4.2% for LH and 2.7 and 5.5% for FSH, respectively.

Statistical Evaluation of Gonadotropin Secretion

LH and FSH pulses were detected by the Thomas' algorithm, by analysis of LH and FSH concentrations in samples collected at 10-min intervals, as reported elsewhere [20, 29, 30]. Mean serum LH and FSH levels during saline (n = 72 measurements of each gonadotropin) or kisspeptin (n = 72 measurements of each gonadotropin) infusions were compared in each of the 4 patients by the paired parametric t test.

In the 3 male patients (subjects 1, 2 and 4; table 1) mean serum testosterone levels (n = 12 measurements during each treatment), mean serum inhibin B levels (n = 12 measurements during each treatment) and mean serum estradiol levels (n = 12) were compared by the paired parametric t test.

Statistical differences in mean pulse frequencies, hormone concentrations and area under the curve (AUC) were analyzed using GraphPad Prism 5 using a paired t test, where one-tailed p values <0.05 were considered statistically significant.

Results

The 2 patients with *TAC3*-inactivating mutations and the 2 patients with *TACR3*-inactivating mutations were of reproductive age between 21 and 31 years and have been previously described in detail [20]. In this study we confirmed that they all had low circulating LH concentrations but normal or near-normal FSH, low inhibin B, low testosterone in the 3 males and low estradiol in the female patient (table 1). Circulating LH and FSH concentrations and pulsatility during 12 h vehicle (saline) or kisspeptin-10 (1.5 μg/kg/h) infusions are shown in figures 1 and 2 and in table 1. During the 12 h of vehicle infusion (10-min sampling frequency) LH concentrations were lower than normal in all 4 patients with either ligand or receptor-inactivating mutations (fig. 1, 2; table 1). Patient 2, who had the identical inactivating mutation to patient 1, had residual LH activity as there were two distinct LH pulses and a higher mean LH, albeit well below normal (fig. 1, 2; table 1).

Intravenous infusion of kisspeptin-10 elicited a slow initial LH response followed by a sustained reinstatement of LH pulses in all 4 patients and a concomitant increase in gonadal steroids and inhibin B (fig. 1, 2; table 1). There was also a significant increase in the mean LH concentration and LH AUC (fig. 2). Although FSH concentrations were normal on vehicle fusion, there was a significant stimulation in mean concentrations and pulse frequency (fig. 1, 2; table 1). Interestingly, quite a few of the FSH pulses were coincident with LH pulses, which is not readily discernible in normal subjects.

Discussion

Effects of Deficient NKB Signaling on Gonadotropins

The scenario of normal or near-normal FSH (2.1–5.4 IU/ml) but low LH (0.2–0.62 IU/ml) and gonadal steroid levels in the patients with NKB signaling mutations is

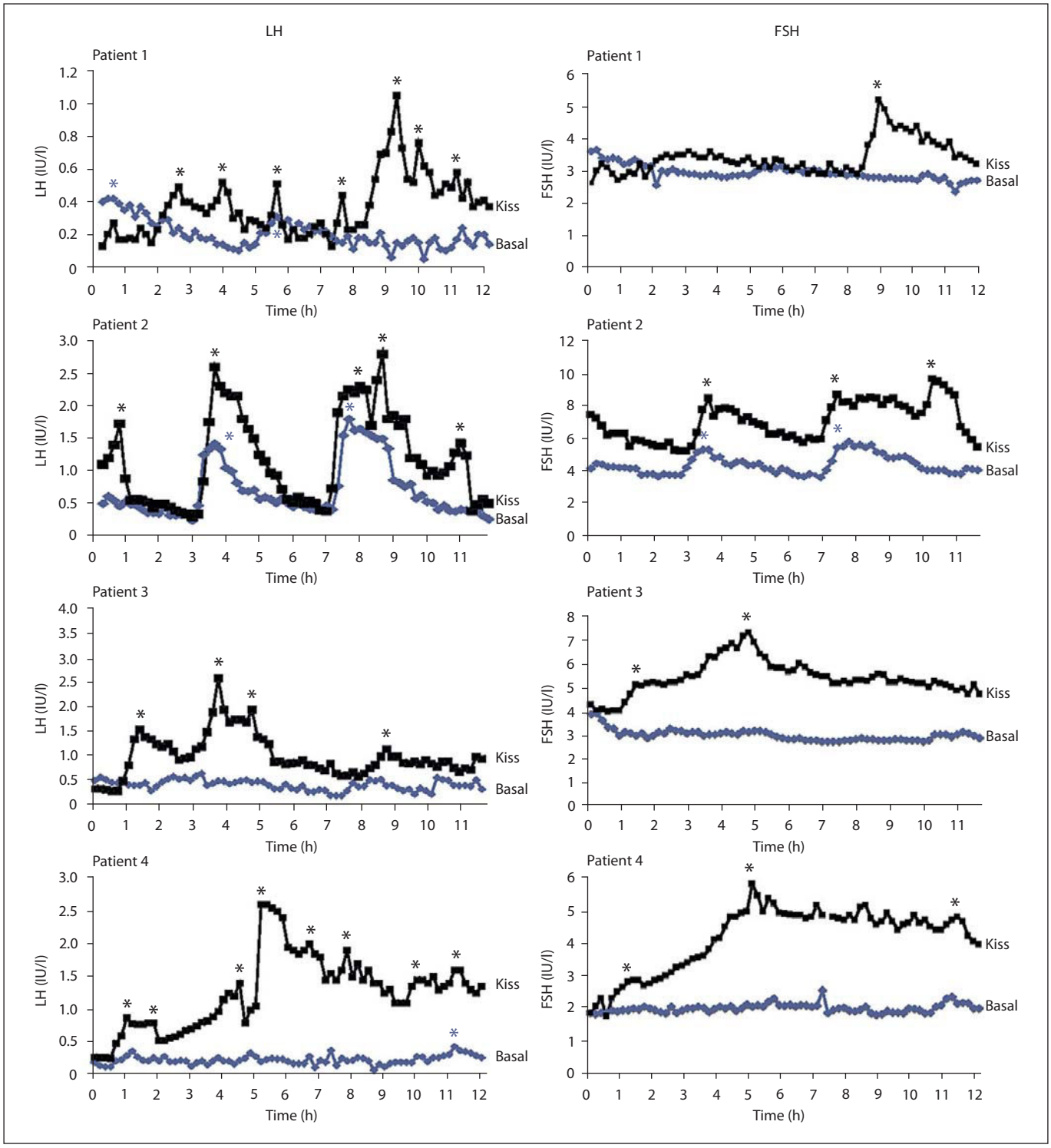


Fig. 1. Secretory pattern of LH and FSH in 2 patients with NKB *(TAC3)* biallelic mutations (1 and 2) and 2 patients with NK3R *(TACR3)* biallelic mutations (3 and 4) during infusion of saline (◆) or kisspeptin-10 (■). Asterisks denote LH pulses as identified with the Thomas' algorithm.

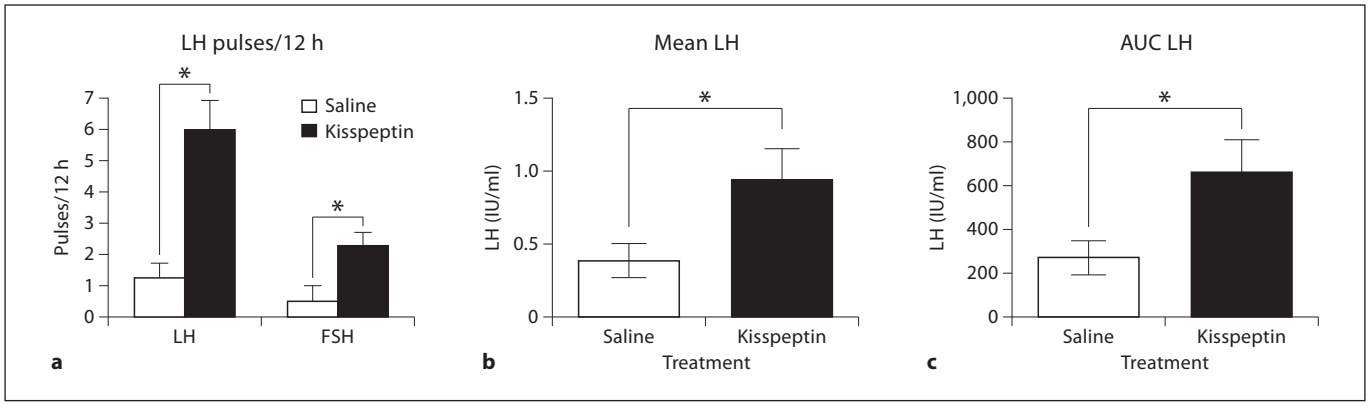


Fig. 2. Effects of continuous kisspeptin-10 on LH pulse frequency, mean LH levels and AUC: (**a**) mean (±SEM) frequency of gonadotropin pulses, (**b**) mean (±SEM) LH levels, and (**c**) mean (±SEM) LH AUC in 4 patients with hypogonadotropic hypogonadism caused by NKB *(TAC3)* or NK3R *(TACR3)* mutations receiving vehicle (white column) and kisspeptin (black column). * $p < 0.05$ paired t test.

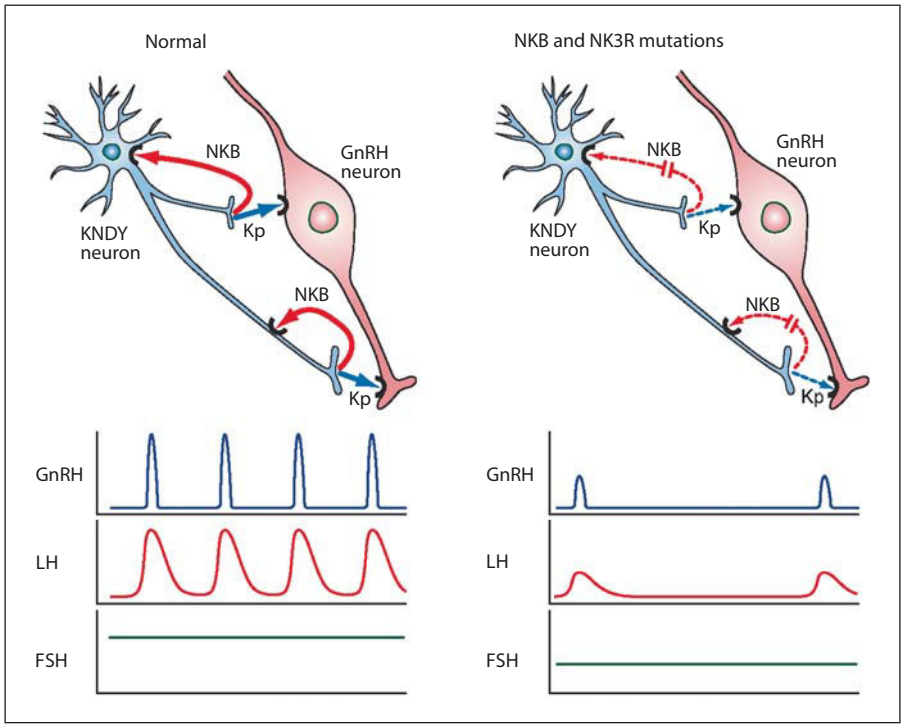


Fig. 3. Schematic of proposed actions of a KNDY neuron on GnRH secretion summarizing findings from human and animal studies. Impacts of NKB and kisspeptin release on GnRH neuron secretion and LH and FSH responses in normal subjects (left) and patients with NKB- and NK3R-inactivating mutations (right). In normal subjects NKB acts in an autocrine (shown) or possibly paracrine (not shown) modality to reinforce kisspeptin secretion, which stimulates the GnRH neuron to secrete GnRH in pulses with a frequency interval of about 90 min. This results in corresponding LH pulses and normal FSH levels. In patients with NKB-inactivating *(TAC3)* and NK3R-inactivating *(TACR3)* mutations the absence of NKB stimulation of the KNDY neuron results in low kisspeptin secretion and resulting low GnRH pulse frequency with correspondingly low LH pulse frequency and amplitude, and lower end of normal FSH secretion. Continuous infusion of kisspeptin overrides this deficiency to restore the normal pattern of LH pulses and a small increase in FSH. Note that the most parsimonious scheme involving kisspeptin and NKB is presented. In reality a greater complexity of regulation of the KNDY neuron including DYN and other regulators, as well as additional inputs into the GnRH neuron will be operative.

compatible with deficient (low) GnRH pulse frequency, which favors FSH gene transcription [23] and secretion [33] over that of LH. This contrasts with inactivating mutations of kisspeptin signaling, which results in low circulating concentrations of both gonadotropins [2, 11, 12]. This also indicates that inactivating mutations of NKB signaling give rise to a less severe hypogonadotropic phenotype and suggests that NKB signaling is upstream of kisspeptin signaling in the neuroendocrine hierarchy of GnRH regulation.

Both patients with inactivating mutations in *TACR3* and patient 1 with an inactivating mutation in *TAC3* had very low LH levels (0.2, 0.22 and 0.42 IU/ml) and no evidence of pulses. Thus, inactivating mutations of either the ligand or receptor have a similar phenotype suggesting that compensatory utilization of a ligand or receptor homolog does not occur. However, there have been reports of spontaneous recovery of fertility in patients with mutations in NKB signaling [34] but this did not take place in our patients. Interestingly, patient 2, who had the same mutations of *TAC3* as patient 1 and which result in a failure to produce active proteins, had higher LH (0.65 IU/ml) and two pulses during the control 12 h infusion. This suggests that dependence of LH pulse generation on NKB input varies between individuals. Individual variations in severity of phenotype have also been noted in kisspeptin and kisspeptin receptor knockout mice [35].

Responses to Kisspeptin-10 Infusion

Continuous kisspeptin infusion stimulated LH responses but these were generally slower and at a lower concentration than that observed in our previous studies utilizing the same protocol in normal men [16] and in other studies with acute administration of kisspeptin-10 [36] or kisspeptin-54 in man [37], or continuous infusion in sheep [38]. However, the fold stimulation in the patients (mean 3.1-fold) was similar to that found in normal men (3.2-fold) receiving the identical continuous infusion dose [16]. The slower response and lower absolute level of response is possibly due to atrophy of GnRH neurons and gonadotropes in the afflicted patients. In support of the latter, in previous studies on these patients, it was necessary to repeat GnRH stimulations (priming) to elicit a robust LH response [20]. Recovery of the gonadotrope with prolonged stimulation seems evident as the LH pulses increased in amplitude with increasing time of exposure to kisspeptin-10 (fig. 1).

The patients also exhibited an increase in FSH during kisspeptin infusion, indicating that, although FSH concentrations were normal, there is capacity for additional response with an increase in GnRH pulse frequency. The increase (mean 1.7-fold) was much lower than the LH increase and similar to that seen for FSH in normal males (mean 1.8-fold) [16].

There were also significant increases in inhibin B in all patients and in testosterone in the males and estradiol in the single female studied, reflecting the increases in LH and FSH.

In addition to stimulating mean LH concentrations, continuous kisspeptin infusion clearly elicited pulsatile secretion of LH in all 3 of the patients who had an absence of LH pulses, and increased the pulse frequency from 2 to 5 in patient 2 over the 12 h. While LH pulses were restored to a frequency approaching normality (mean of 0.5 per hour compared with 0.7 per hour in our studies on untreated normal men) the amplitude and LH AUC was well below normal. This suggests that GnRH function is restored more readily than gonadotrope function after kisspeptin infusion. It may have been instructive to determine whether a continuation of kisspeptin infusion would have completely restored LH pulse amplitude and whether GnRH priming would have normalized the LH response to continuous kisspeptin infusion. Such studies will have to be the subject of future research as they were not feasible here for ethical and logistical reasons.

We have previously reported that continuous infusion of kisspeptin-10 at the same dose (1.5 μg/kg/h) increased the LH pulse frequency in normal men [16]. Thus the current findings support this observation but are even more persuasive as the baseline pulse frequency was nil or very low (mean 0.1 per hour) and was increased at least fivefold to 0.5 per hour. In contrast, the pulse frequency in the normal men was increased from 0.7 to 1.0 per hour. Since LH pulses are well established to be coincident with, and dependent on, GnRH pulses [39, 40, also see reviews 2, 3, 41], it is reasonable to interpret that continuous kisspeptin-10 infusion in the current study increases GnRH pulse frequency.

Kisspeptin-10 in GnRH Pulse Generation

A number of studies point to a role for kisspeptin in GnRH pulsatility in support of our findings. Kisspeptin is localized to KNDY neurons in the ARC [13, 14, 17, 28] which is associated with GnRH pulse generation [42, 43], and kisspeptin stimulates GnRH neuron firing [44–46]. Kisspeptin has also been shown to stimulate GnRH secretion from hypothalamic explants [47], and in vivo in monkeys [48]. Perhaps the most convincing evidence for a direct role of ARC kisspeptin in pulse generation was

the demonstration that administration of kisspeptin antagonist in the ARC of ovariectomized rats decreased LH pulse frequency [15]. Microdialysis studies in pubertal monkeys also demonstrated that intracerebroventricular kisspeptin antagonist inhibited GnRH pulses [46]. Since the multi-unit electrical activity recorded in the ARC is coincident with LH pulses [42, 43] it is tempting to propose that multi-unit electrical activity in the ARC will be correlated with pulsatile kisspeptin secretion which in turn generates GnRH pulsatility [13, 14, 49]. However, our demonstration that continuous kisspeptin infusion increases LH pulse frequency in normal men and in our patients with NKB signaling deficiencies appears to run counter to this, and suggests that the delivery of kisspeptin to the GnRH neuron in a continuous modality is sufficient to entrain GnRH pulsatility, either independently or in concert with other neural inputs. The sustained stimulation of GnRH neuron firing on exposure to kisspeptin might be interpreted as supporting this suggestion as the stimulation of firing lasts about 20 min [44–46] which is much more protracted than a GnRH pulse. The above interpretation does not intend to imply that kisspeptin is not delivered to the GnRH neuron in a pulsatile modality [48] but simply that, while kisspeptin is a prerequisite for GnRH pulsatile secretion, pulsatile delivery is not, and GnRH pulsatility is apparently independent of kisspeptin pulsatility. There is evidence that GnRH neurons have the ability to independently generate pulsatile GnRH release [50, 51] and kisspeptin input may reinforce this endogenous rhythm.

It can be argued that the restoration of LH pulsatility in our patients might arise through a low level of endogenous kisspeptin pulsatility superimposed on the constant circulating kisspeptin provided by continuous infusion. However, this is an unlikely explanation as the infusion dose we employed gives rise to near-maximum LH stimulation [16], thus negating any major contribution from endogenous kisspeptin. Moreover, constant infusion of kisspeptin in normal men with normal LH pulsatility was shown to increase LH pulse frequency [16].

Hierarchy of NKB and Kisspeptin in GnRH Stimulation

The failure of humans with inactivating mutations in the kisspeptin/GPR54 or NKB/NK3R signaling systems to progress through puberty [11, 12, 19, 20], and the restoration of gonadotropin secretion by exogenous pulsatile GnRH administration [2, 20] indicates that these systems are proximal (upstream) to GnRH neurons. The ability to inhibit kisspeptin-stimulated gonadotropin release with GnRH antagonists and the localization of GPR54 to GnRH neurons further supports this conclusion [2, 9, 10, 13, 52].

While this proximal position of kisspeptin and NKB to GnRH in the neuroendocrine hierarchy is indisputable, the precise mechanism by which they interactively regulate GnRH pulsatility has not been established. An important outcome of our study is that kisspeptin alone in the absence of NKB signaling is sufficient to generate LH (and by inference GnRH) pulsatility, suggesting NKB actions are upstream of kisspeptin. Since NKB and kisspeptin are co-localized in the KNDY neurons in the ARC [13, 14, 17, 18] (which plays a role in GnRH pulse generation) [42, 43, 49], the observation that continuous infusion of kisspeptin can restore LH pulsatility in our patients suggests that NKB has an autocrine/paracrine action to induce kisspeptin and thus GnRH secretion as schematically represented in figure 3. This is similar to schemes proposed by others [13, 14, 26–28, 53].

Our deduction from the current findings that NKB operates upstream of GnRH neurons by stimulating kisspeptin secretion from KNDY neurons, and not by direct activation of GnRH neurons, is supported by some data from animal studies. Firstly, *TAC3R* is expressed in ARC KNDY neurons in mice [27], rat [54] and sheep [25] while *TAC3R* expression was reported to be absent, or was not observed, in GnRH neurons of mice and sheep [13, 25]. Secondly, studies on the effects of NKB and analogs in mice, monkeys, sheep and goats on LH secretion have suggested a modulatory role for NKB in the release of kisspeptin by KNDY neurons in the ARC [13, 14, 24, 27, 28, 49, 55]. Thirdly administration of a NKB agonist to rats induced c-fos expression in KNDY neurons but was not observed in GnRH neurons in this study [28]. Fourthly, we have shown that kisspeptin antagonist alone slowed LH pulse frequency when administered into the ARC in ovariectomized adult rats [15] and apparently slowed LH pulses in ovariectomized sheep [46]. We have further supported the concept that NKB acts upstream of kisspeptin by demonstrating that the increase in LH pulse frequency resulting from treatment with the NKB agonist, senktide, in intact juvenile female rats is prevented by kisspeptin antagonist [P. Grachev et al., unpubl. data]. Although these findings present a persuasive argument, there have been reports of TAC3R expression in rat GnRH neurons [26, 54] which apparently runs counter to our interpretation. These contradictory reports on expression of the NKB receptor on GnRH neurons require resolution through the demonstration of functional receptor protein or not in GnRH neurons. Interpretation of NKB's

role in gonadotropin regulation is further complicated in rodents as it appears to have both inhibitory and stimulatory effects depending on physiological status [27, 28, 56] and NKB knockout mice do not apparently have impaired reproduction in contrast to our patients [21, 22]. The findings in rodent models therefore appear to differ from sheep [24], monkeys [55] and now humans, which consistently demonstrate a stimulatory role for NKB upstream of kisspeptin.

Therapeutic Implications

Our findings have implications for therapeutic interventions in various dysfunctions of the reproductive system. In conditions of decreased LH production and near-normal FSH secretion (i.e. due to low GnRH pulse frequency) such as hypothalamic amenorrhea or delayed puberty [5], restoration of LH and normal reproductive function may potentially be achieved by treatment with NKB or kisspeptin agonists. Unlike GnRH that needs to be administered in a pulsatile manner to elicit augmentation of LH pulse frequency, it appears that kisspeptin can be administered continuously for at least 3 days [George et al., unpubl. data] to stimulate LH and gonadal steroid hormone secretion. Conversely, conditions characterized by high LH pulse amplitude and frequency such as polycystic ovarian syndrome [6] may be treatable by NKB antagonists or kisspeptin antagonists. We have previously reported that kisspeptin antagonists reduce LH pulse frequency and amplitude but do not lower basal LH levels [15, 46, 57] in contrast to GnRH antagonist administration, suggesting that kisspeptin or NKB antagonists may be suitable for partial suppression of gonadotropins and gonadal steroids in hormone-dependent diseases, such as endometriosis and benign prostatic hyperplasia, without inducing bone loss or hot flushes that occur with GnRH analog therapy [57]. A potential limitation in the therapeutic use of kisspeptin agonists is tachyphylaxis, which has been reported with long-term (2 weeks) administration of kisspeptin-54 to women with hypothalamic amenorrhea [58] and rapidly in juvenile [59] and adult [53] monkeys. However, we have observed no evidence of tachyphylaxis in the current study and in men receiving continuous infusion of kisspeptin-10 at near-maximal LH-stimulating levels over 22 h [16].

In summary, our findings that kisspeptin administration restores LH pulsatility in infertile patients with NKB- or NK3R-inactivating mutations have provided insight into the hierarchy and interplay of kisspeptin and NKB in GnRH pulse generation in humans. The findings suggest a number of novel approaches to treating dysfunctions of the reproductive system and hormone-dependent diseases.

Acknowledgements

The work was supported by the Medical Research Council, the Universities of Pretoria and Cape Town during article write-up, and in part by institutional grants from Paris-Sud University (Bonus Qualité Recherche), Agence Nationale de la Recherche (ANR KalGenopath 2010), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), INSERM (U693), and Agence Française de Lutte Contre le Dopage (AFLD).

Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to disclose.

References

1 Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, et al: Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. Science 1971;173:1036–1038.

2 Balasubramanian R, Dwyer A, Seminara SB, Pitteloud N, Kaiser UB, Crowley WF: Human GnRH deficiency: a unique disease model to unravel the ontogeny of GnRH neurons. Neuroendocrinology 2010;92:81–99.

3 Millar RP: GnRHs and GnRH receptors. Anim Reprod Sci 2005;88:5–28.

4 Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E: Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. Science 1978;202:631–633.

5 Gordon CM: Clinical practice. Functional hypothalamic amenorrhea. N Engl J Med 2010;363:365–371.

6 Blank SK, McCartney CR, Marshall JC: The origins and sequelae of abnormal neuroendocrine function in polycystic ovary syndrome. Hum Reprod Update 2006;12:351–361.

7 Wolfe A, Wu S: Estrogen receptor-β in the gonadotropin-releasing hormone neuron. Semin Reprod Med 2012;30:23–31.

8 Louis GW, Greenwald-Yarnell M, Phillips R, Coolen LM, Lehman MN, Myers MG Jr: Molecular mapping of the neural pathways linking leptin to the neuroendocrine reproductive axis. Endocrinology 2011;152:2302–2310.

9 Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA: Kisspeptin signaling in the brain. Endocr Rev 2009;30:713–743.

10 Roseweir AK, Millar RP: The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. Hum Reprod Update 2009;15:203–212.

11 De Roux N, Genin E, Carel J-C, Matsuda F, Chaussain J-L, Milgrom E: Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:10972–10976.

12 Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK, et al: The GPR54 gene as a regulator of puberty. N Engl J Med 2003;349:1614–1627.

13 Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL: Kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. Endocrinology 2010;151: 3479–3489.
14 Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K: Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. J Neurosci 2010;30:130–138.
15 Li X-F, Kinsey-Jones JS, Cheng Y, Knox AMI, Lin Y, Petrou NA, et al: Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat. PLoS ONE 2009;4:e8334.
16 George JT, Veldhuis JD, Roseweir AK, Newton CL, Faccenda E, Millar RP, et al: Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. J Clin Endocrinol Metab 2011;96:E1228–E1236.
17 Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CVR, Jafarzadehshirazi MR, et al.: Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. Endocrinology 2007;148: 5752–5760.
18 Navarro VM, Gottsch ML, Wu M, García-Galiano D, Hobbs SJ, Bosch MA, et al: Regulation of NKB pathways and their roles in the control of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the male mouse. Endocrinology 2011;152:4265–4275.
19 Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, et al: TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for neurokinin B in the central control of reproduction. Nat Genet 2009;41:354–358.
20 Young J, Bouligand J, Francou B, Raffin-Sanson M-L, Gaillez S, Jeanpierre M, et al: TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. J Clin Endocrinol Metab 2010;95:2287–2295.
21 Nordquist RE, Delenclos M, Ballard TM, Savignac H, Pauly-Evers M, Ozmen L, et al: Cognitive performance in neurokinin-3 receptor knockout mice. Psychopharmacology (Berl) 2008;198:211–220.
22 Kung TT, Crawley Y, Jones H, Luo B, Gilchrest H, Greenfeder S, et al: Tachykinin NK3-receptor deficiency does not inhibit pulmonary eosinophilia in allergic mice. Pharmacol Res 2004;50:611–615.
23 Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC: The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. Endocrinology 1989;125:917–924.
24 Billings HJ, Connors JM, Altman SN, Hileman SM, Holaskova I, Lehman MN, et al: Neurokinin B acts via the neurokinin-3 receptor in the retrochiasmatic area to stimulate luteinizing hormone secretion in sheep. Endocrinology 2010;151:3836–3846.
25 Amstalden M, Coolen LM, Hemmerle AM, Billings HJ, Connors JM, Goodman RL, et al: Neurokinin 3 receptor immunoreactivity in the septal region, preoptic area and hypothalamus of the female sheep: colocalisation in neurokinin B cells of the arcuate nucleus but not in gonadotrophin-releasing hormone neurones. J Neuroendocrinol 2010;22:1–12.
26 Burke MC, Letts PA, Krajewski SJ, Rance NE: Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. J Comp Neurol 2006;498:712–726.
27 Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA: Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. J Neurosci 2009;29:11859–11866.
28 Navarro VM, Castellano JM, McConkey SM, Pineda R, Ruiz-Pino F, Pinilla L, et al: Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. Am J Physiol Endocrinol Metab 2011;300:E202–E210.
29 Bouligand J, Ghervan C, Tello JA, Brailly-Tabard S, Salenave S, Chanson P, et al: Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. N Engl J Med 2009;360:2742–2748.
30 De Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, Chanson P, Schaison G, et al: A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. N Engl J Med 1997;337:1597–1602.
31 Salenave S, Chanson P, Bry H, Pugeat M, Cabrol S, Carel J-C, et al: Kallmann's syndrome: a comparison of the reproductive phenotypes in men carrying KAL1 and FGFR1/KAL2 mutations. J Clin Endocrinol Metab 2008;93:758–763.
32 Trabado S, Maione L, Salenave S, Baron S, Galland F, Bry-Gauillard H, et al: Estradiol levels in men with congenital hypogonadotropic hypogonadism and the effects of different modalities of hormonal treatment. Fertil Steril 2011;95:2324–2329,e1–3.
33 Wildt L, Häusler A, Marshall G, Hutchison JS, Plant TM, Belchetz PE, et al: Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. Endocrinology 1981;109:376–385.
34 Gianetti E, Tusset C, Noel SD, Au MG, Dwyer AA, Hughes VA, et al: TAC3/TACR3 mutations reveal preferential activation of gonadotropin-releasing hormone release by neurokinin B in neonatal life followed by reversal in adulthood. J Clin Endocrinol Metab 2010;95:2857–2867.
35 Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, Chan Y-M, Mahan A, Cerrato F, et al: Kiss1–/– mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54–/– mice. Endocrinology 2007;148: 4927–4936.
36 Chan Y-M, Butler JP, Pinnell NE, Pralong FP, Crowley WF, Ren C, et al: Kisspeptin resets the hypothalamic GnRH clock in men. J Clin Endocrinol Metab 2011;96:E908–E915.
37 Dhillo WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, et al: Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. J Clin Endocrinol Metab 2005;90: 6609–6615.
38 Caraty A, Smith JT, Lomet D, Ben Saïd S, Morrissey A, Cognie J, et al: Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. Endocrinology 2007;148:5258–5267.
39 Antunes JL, Carmel PW, Housepian EM, Ferin M: Luteinizing hormone-releasing hormone in human pituitary blood. J Neurosurg 1978;49:382–386.
40 Clarke IJ, Cummins JT: The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone and luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes. Endocrinology 1982;111:1737–1739.
41 Millar RP, Lu Z-L, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K, Maudsley SR: Gonadotropin-releasing hormone receptors. Endocr Rev 2004;25:235–275.
42 Knobil E: The GnRH pulse generator. Am J Obstet Gynecol 1990;163:1721–1727.
43 Ohkura S, Tsukamura H, Maeda K: Effects of various types of hypothalamic deafferentation on luteinizing hormone pulses in ovariectomized rats. J Neuroendocrinol 1991;3:503–508.
44 Han S-K, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, et al: Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. J Neurosci 2005;25: 11349–11356.
45 Pielecka-Fortuna J, Chu Z, Moenter SM: Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. Endocrinology 2008;149:1979–1986.
46 Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, Guerriero KA, Morgan K, Pielecka-Fortuna J, et al: Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. J Neurosci 2009; 29:3920–3929.
47 Messager S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, et al: Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102: 1761–1766.

48 Keen KL, Wegner FH, Bloom SR, Ghatei MA, Terasawa E: An increase in kisspeptin-54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo. Endocrinology 2008;149:4151–4157.
49 Maeda K-I, Ohkura S, Uenoyama Y, Wakabayashi Y, Oka Y, Tsukamura H, et al: Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. Brain Res 2010;1364:103–115.
50 Martínez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI: Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses: intrinsic properties of the GT1–1 GnRH neuronal cell line. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:1852–1855.
51 Terasawa E, Keen KL, Mogi K, Claude P: Pulsatile release of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in cultured LHRH neurons derived from the embryonic olfactory placode of the rhesus monkey. Endocrinology 1999;140:1432–1441.
52 Herbison AE, de Tassigny XD, Doran J, Colledge WH: Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. Endocrinology 2010;151:312–321.
53 Ramaswamy S, Seminara SB, Pohl CR, Dipietro MJ, Crowley WF, Plant TM: Effect of continuous intravenous administration of human metastin 45–54 on the neuroendocrine activity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). Endocrinology 2007;148:3364–3370.
54 Krajewski SJ, Anderson MJ, Iles-Shih L, Chen KJ, Urbanski HF, Rance NE: Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin-3 receptors in the rat median eminence. J Comp Neurol 2005;489:372–386.
55 Ramaswamy S, Seminara SB, Plant TM: Evidence from the agonadal juvenile male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) for the view that the action of neurokinin B to trigger gonadotropin-releasing hormone release is upstream from the kisspeptin receptor. Neuroendocrinology 2011;94:237–245.
56 Sandoval-Guzmán T, Rance NE: Central injection of senktide, an NK3 receptor agonist, or neuropeptide Y inhibits LH secretion and induces different patterns of Fos expression in the rat hypothalamus. Brain Res 2004;1026:307–312.
57 Millar RP, Roseweir AK, Tello JA, Anderson RA, George JT, Morgan K, et al: Kisspeptin antagonists: unraveling the role of kisspeptin in reproductive physiology. Brain Res 2010;1364:81–89.
58 Jayasena CN, Nijher GMK, Chaudhri OB, Murphy KG, Ranger A, Lim A, et al: Subcutaneous injection of kisspeptin-54 acutely stimulates gonadotropin secretion in women with hypothalamic amenorrhea, but chronic administration causes tachyphylaxis. J Clin Endocrinol Metab 2009;94:4315–4323.
59 Seminara SB, Dipietro MJ, Ramaswamy S, Crowley WF, Plant TM: Continuous human metastin 45–54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. Endocrinology 2006;147:2122–2126.

Errata

In the article 'Effect of Ovarian Hormones on the Hypothalamic Excitatory Amino Acids System during Sexual Maturation in Female Rats' by Carbone et al. [Neuroendocrinology 1995;61:235–242], the name of an author was published incompletely. The correct full name is Matilde E. Otero-Losada (i.e. Otero-Losada, M.E.).

In the article 'Gonadotropin-Inhibitory Hormone Is a Hypothalamic Peptide That Provides a Molecular Switch between Reproduction and Feeding' by Clarke et al. [Neuroendocrinology 2012;95:305–316], the second affiliation of Robert P. Millar was missing. It is 'Mammal Research Institute, Department of Zoology, University of Pretoria, Pretoria, South Africa'.

Conclusion de l'article *Young et al. Neuroendocrinology 2013*

L'administration de Kisspeptine restaure la sécrétion pulsatile de LH chez les patients atteints de nCHH en l'absence de signalisation de la Neurokinine B.

La Kisspeptine seule est suffisante pour restaurer une pulsatilité de la GnRH et l'augmentation pulsatile des gonadotrophines et des stéroïdes sexuels chez les patients dont la signalisation de la Neurokinine B est invalidée.

Nos résultats montrent que la signalisation de la Neurokinine B ne module pas directement la pulsatilité de la GnRH et que cette voie se situe en amont de la signalisation des Kisspeptines. Le modèle d'interaction entre les neurones KNDy et les neurones à GnRH est également renforcé chez l'homme et apparait être différent selon les espèces. De plus, cette expérience démontre que la signalisation de la Kisspeptine n'a pas besoin d'être pulsatile (perfusion continue) pour que la GnRH soit, elle, sécrétée de façon pulsatile.

Ce mode d'administration en continu ne restaure pas un profil parfaitement physiologique de la sécrétion des gonadotrophines. Néanmoins, la Kisspeptine semble plus facile à utiliser pour traiter les retards pubertaires et les HHC que les agonistes de GNRHR nécessitant une administration pulsatile. L'utilisation des analogues des Kisspeptines pourrait donc être une thérapeutique future et prometteuse de ces maladies.

Description statistique de la série de patients atteints de nCHH

Introduction

Les travaux précédents ont été réalisés à partir de la série de patients nCHH suivis dans le service d'Endocrinologie et de Maladies de la Reproduction de Bicêtre sous la coordination du Pr. Jacques Young.

Il s'agit de 874 cas index pour lesquels un prélèvement sanguin a été adressé au service de Génétique moléculaire, Pharmagénétique et Hormonologie de Bicêtre pour un bilan génétique entre janvier 2006 et juin 2015. Une majorité d'hommes y est représentée, 544 hommes et 330 femmes, soit 62 %.

De façon générale, le screening de ces gènes pour ces patients a été réalisé comme suit : les gènes « nCHH » *GNRHR* puis *KISS1R* puis *TAC3* et *TACR3* et enfin *KISS1*. Dans un second temps ces patients nCHH ont été examinés pour les gènes identifiés dans le syndrome de Kallmann. Cette façon de procéder se reflète dans les effectifs séquencés.

Résultats

Des variants rares de gènes impliqués dans les nCHH sont retrouvés dans 19,6 % des cas (172/874 patients).

Dans les gènes des récepteurs provoquant des nCHH de transmission récessive, nous retrouvons comme attendu théoriquement mais rarement observé dans les séries publiées, majoritairement des patients avec variants biallèliques (57, 67 et 54 % pour *GNRHR, KISS1R et TACR3* respectivement) parmi les patients porteurs de variants rares **(*cf.* Tableau 1 et Histogramme)**.

	FGFR1	FGF8	PROKR2	PROK2	KAL1	SEMA3A	GNRHR	KISS1R	TACR3	GnRH1	TAC3	KISS1
Effectif des patients séquencés	238	29	159	158	142	45	624	603	410	470	411	317
Nombre de patients Hétérozygote	43	3	12	4	14	4	16	2	5	6	2	0
Nombre de patients Biallélique	1	0	3	2	1	0	24	8	7	1	3	0
Nombre de patients Digénique	4	0	0	0	0	1	2	2	1		1	0
Total des patients porteurs d'un variant	48	3	15	6	15	5	42	12	13	7	6	0
% de patients Biallélique	2,1	0,0	20,0	33,3	6,7	0,0	57,1	66,7	53,8	14,3	50,0	0,0
% de patients Digénique	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	4,8	16,7	7,7	0,0	16,7	0,0

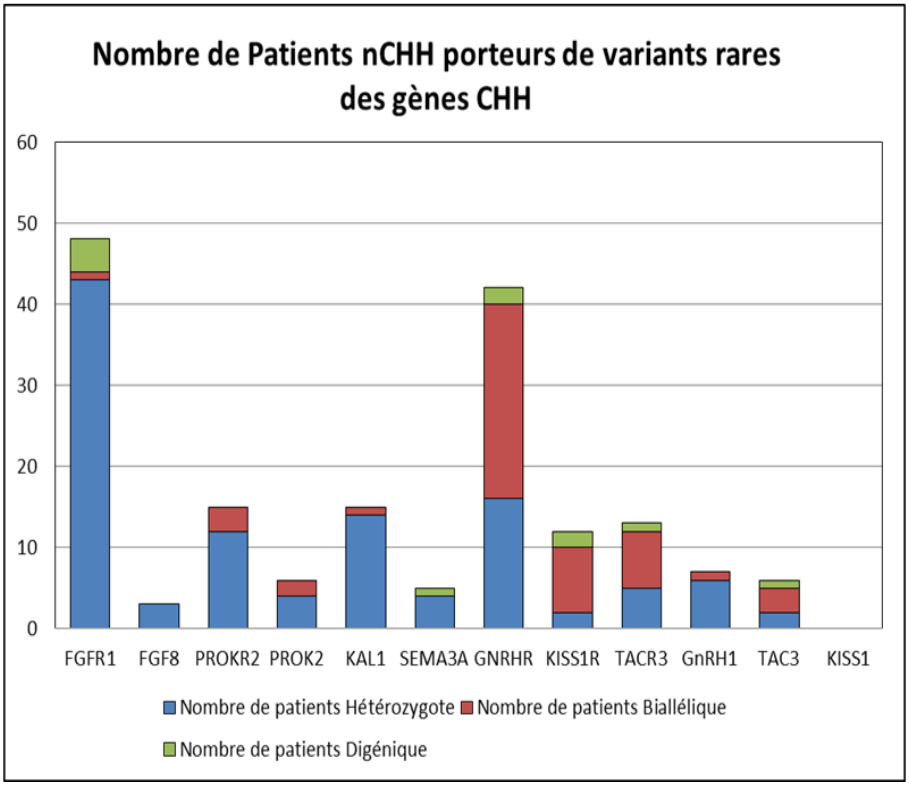


Tableau 1 : Table et Histogramme des 874 patients nCHH analysés au laboratoire de Génétique de Bicêtre.

Pour les gènes identifiés dans le syndrome de Kallmann et provoquant des CHH de transmission dominante ou lié à l'X (*KAL1, FGRFR1, FGF8*), le résultat est également conforme à celui attendu avec une très grande majorité de patients hétérozygotes ou hémizygote. Pour les autres gènes identifiés dans le syndrome de Kallmann, certains n'ont pas encore de statut de transmission tranchée dans la littérature (*PROK2, PROR2, SEMA3A*). D'après notre série de patients nCHH nous retrouvons partiellement cette difficulté : *FGF8* est ici compatible avec le mode dominant à 100 %. Trente-trois pour cent et 20 % des patients porteurs de variants *PROK2* et *PROKR2* sont plutôt compatibles avec un modèle de transmission récessif. Les patients porteurs de variants de *SEMA3A* semblent correspondre dans cette série à un mode de transmission dominant **(*cf.* Tableau 1 et Histogramme)**.

La part du digénisme ou de l'oligogénisme est quant à elle tout à fait réduite dans cet échantillon de la population **(*cf.* Tableau 1 et Histogramme)**.

Les variants identifiés sur les gènes codant les ligands sont moins nombreux à effectifs séquencés équivalents. La cause de cette disparité pourrait ne pas être simplement biologique (importance de la dimérisation des récepteurs à sept domaines transmembranaires, effets dominant négatifs *etc*…) ainsi aussi et peut être surtout statistique : la taille des séquences codantes des ligands est plus petite (100 à 130 acides aminés autour du décapeptide actif) que celle des récepteurs (368 à 465 acides aminés).

De la même façon *FGFR1* (822 AA), *KAL1* (680 AA), *SEMA3A* (771 AA) révèlent de nombreux variants malgré des effectifs de séquençage moins élevés, un biais de recrutement de patients très important (les Kallmann cliniques sont exclus) et un biais de sélection des variants du fait du mode de transmission dominant (handicap de transmission du fait de l'infertilité ou l'hypofertilité des porteurs). Ceci est peut-être dû en partie à la taille plus importante de séquences analysées.

Conclusion

L'ordre d'analyse des gènes n'a pas été effectué de façon constante dans le temps et le nombre de patients analysés pour chaque gène résulte de l'histoire particulière des découvertes et des avancées techniques du laboratoire. Ainsi plusieurs gènes ont parfois été séquencés simultanément. Dans un grand nombre de cas, la découverte de mutation(s) « suffisante(s) » sur un gène pour expliquer le phénotype d'un patient a stoppé les analyses sur les autres gènes. L'analyse des gènes *TAC3/TACR3* n'a débuté qu'en 2009. Certains patients recrutés avant 2009, sélectionnés selon l'intérêt particulier sur le plan clinique et médical de ces examens, ont été séquencés pour *TAC3/TACR3* de façon rétrospective. Le séquençage de *KISS1* a débuté en routine diagnostique quasiment en même temps que celui de *KISS1R*, néanmoins l'absence de découverte de mutation a abouti à un arrêt du séquençage de ce gène pour la routine diagnostique entrainant un plus petit nombre d'analyses effectuées. Les effectifs inférieurs de patients séquencés pour les gènes du syndrome de Kallmann sont la conséquence de trois processus distincts : les arbres décisionnels pour les patients ayant un profil clinique évoquant un syndrome de Kallmann ou non, l'attente de résultats complémentaires biologiques ou cliniques pour préciser le profil phénotypique du patient ainsi que les accords initiaux de répartition des analyses des gènes des CHH entre le laboratoire de Bicêtre et celui de Cochin. L'ensemble de cet historique crée une série de patients nCHH dont les analyses sont hétérogènes.

Ainsi l'importance des gènes Kallmann dans les nCHH, la prédiction des modes de transmission de la pathologie et la part de l'oligogénisme ne peuvent être aisément déterminée à partir de ces données. La mise en place du séquençage nouvelle génération dans le laboratoire (séquençage simultané de l'ensemble des gènes précités décrits ici et de gènes plus récemment identifiés) permettra à l'avenir de répondre plus exactement à ces questions. Toutefois le pourcentage important de variants identifiés à l'état hétérozygote sur des gènes aux modes de transmission

encore mal défini (*FGF8, SEMA3A, PROK2/PROKR2*) suggère une possible contribution de ces variants à ces modes de transmission du phénotype plus ou moins partiel de nCHH ou de syndrome de Kallmann.

Ces réserves méthodologiques faites, il faut souligner que la quantité et la qualité des données générées par le laboratoire de Bicêtre pour cette pathologie est unique et que l'examen de ces données sur un plan de statistiques descriptives est riche d'enseignement dans la compréhension de l'hétérogénéité génétique de cette population de patients.

PARTIE II :

IDENTIFICATION DE NOUVEAUX GENES DES HH SYNDROMIQUES

Identification de nouveaux gènes par méthodes sans a priori

Article *Young et al. Hum Reprod. 2012*

human reproduction

ORIGINAL ARTICLE *Reproductive endocrinology*

SEMA3A deletion in a family with Kallmann syndrome validates the role of semaphorin 3A in human puberty and olfactory system development

Jacques Young[1,2,3,*], Corinne Metay[4,5], Jerome Bouligand[1,3,6], Bassim Tou[1,3,6], Bruno Francou[1,3,6], Luigi Maione[1,2,3], Lucie Tosca[7], Julie Sarfati[2], Frédéric Brioude[8], Blandine Esteva[8], Audrey Briand-Suleau[4,5], Sophie Brisset[7], Michel Goossens[4,5], Gerard Tachdjian[7], and Anne Guiochon-Mantel[1,3,6]

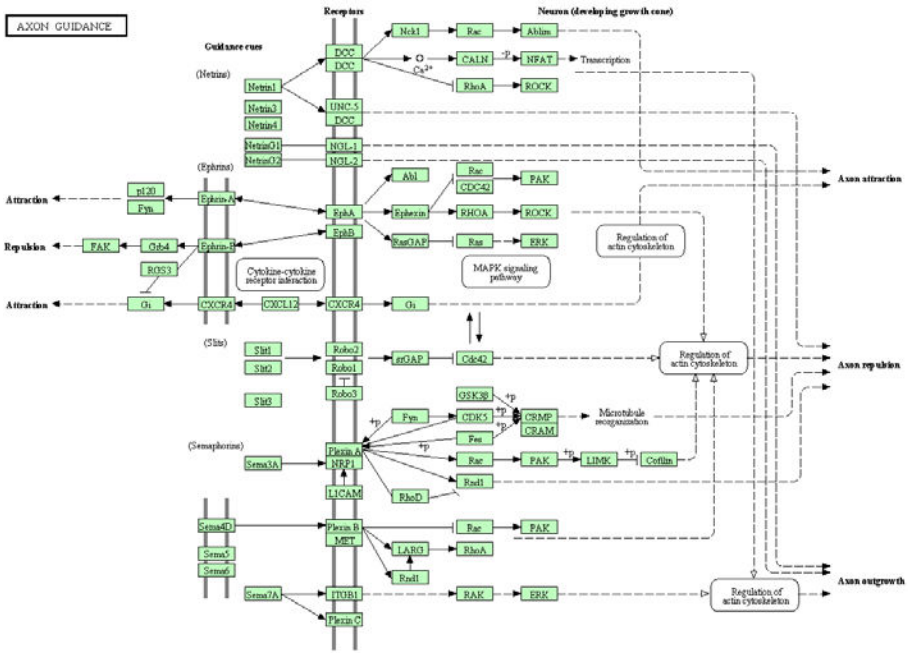


Figure 25 : Représentation schématique des voies de signalisation des facteurs permettant la croissance et l'orientation des axones chez l'homme.
(http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04360)

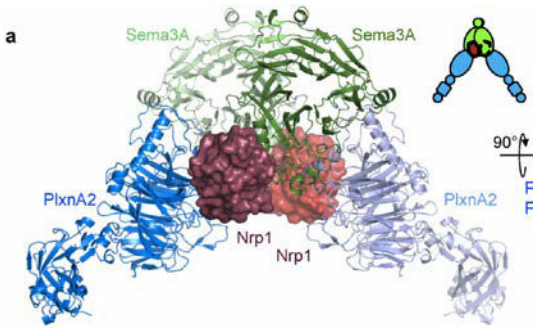


Figure 26 : Structure tridimensionnelle protéique de SEMA3A.
Domaine Sema en vert, domaine PSI en bleu et domaine Ig-C2 en orange.
D'après Janssen et al., Nat Struct Mol Biol., 2013

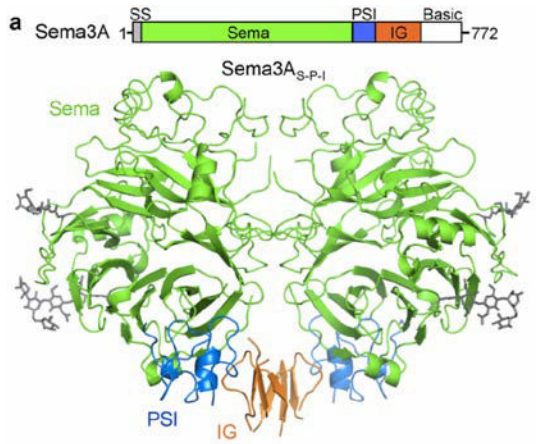


Figure 27 : Structure tridimensionnelle de l'interaction protéique du double trimère de SEMA3A, de la neuropiline1 et de la PlexineA2.
SEMA3A (vert), neuropiline1 (rouge), PlexineA2 (bleu)
D'après Janssen et al., Nat Struct Mol Biol., 2013

Introduction de l'article *Young et al. Hum Reprod. 2012*

Les mutations perte de fonction de *SEMA3A* entrainent un syndrome de Kallmann.

Nous avons rappelé dans la première partie la méthodologie d' *« homozygosity mapping »* utilisée pour la découverte inattendue de trois gènes dans les nHHC. Différentes approches de cytogénétique avaient précédemment été utilisées pour découvrir de nouveaux gènes du syndrome de Kallmann, *KAL1* [177,178] et *FGFR1* [112]. Ces découvertes initiales ont apporté un tout nouvel éclairage sur la physiopathologie de la maladie et elles ont permis indirectement l'identification de nouveaux gènes par l'approche gènes candidats (*FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, FLRT3*) car situés sur la même voie de signalisation **(Cf. Figure 25).**

Nous rapportons ici la découverte d'un nouveau gène *SEMA3A* après l'analyse par CGH-array (Comparative Genomic Hybridization sur puce) de 48 patients atteints du syndrome de Kallmann pour lesquels le séquençage Sanger des gènes connus (*KAL1, FGFR1, FGF8, PROK2, PROKR2, CHD7, WDR11 GNRH1, GNRHR, KISS1R, TAC3* et *TACR3*) et l'établissement de caryotype n'avaient pas permis d'identifier d'anomalies.

SEMA3A code une protéine sécrétée membre de la famille des sémaphorines comprenant un domaine immunoglobuline-like, un domaine PSI (servant à positionner le domaine d'interaction) [179] et un domaine Sema [180] **(Cf. Figure 26)**. La protéine SEMA3A sécrétée pourrait agir sur les cônes de croissance neuronaux comme chimio-répulsif et guider cette croissance sur de longues distances selon son gradient de concentration.

Elle agit sur un récepteur, la plexine A et un corécepteur la neuropiline (NRP1 et PLXNA2 notamment) enchassés dans la membrane cellulaire [181] **(*Cf.* Figure 27)**.

Il s'agit d'une découverte essentielle et qui est en parfait accord avec un défaut de migration des neurones à GnRH et des neurones olfactifs, un mécanisme physiopathologique globalement admis pour le syndrome de Kallmann.

Hum. Reprod. Advance Access published March 12, 2012
Human Reproduction, Vol.0, No.0 pp. 1–6, 2012
doi:10.1093/humrep/des022

human reproduction

ORIGINAL ARTICLE *Reproductive endocrinology*

SEMA3A deletion in a family with Kallmann syndrome validates the role of semaphorin 3A in human puberty and olfactory system development

Jacques Young[1,2,3,*], Corinne Metay[4,5], Jerome Bouligand[1,3,6], Bassim Tou[1,3,6], Bruno Francou[1,3,6], Luigi Maione[1,2,3], Lucie Tosca[7], Julie Sarfati[2], Frédéric Brioude[8], Blandine Esteva[8], Audrey Briand-Suleau[4,5], Sophie Brisset[7], Michel Goossens[4,5], Gerard Tachdjian[7], and Anne Guiochon-Mantel[1,3,6]

[1]UMR-S693, Faculté de Médecine Paris-Sud, Univ Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre, F-94276, France [2]Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction and Centre de Référence des Maladies Endocriniennes Rares de la Croissance, Le Kremlin Bicêtre, F-94275, France [3]INSERM U693, IFR93, 78 rue du Général Leclerc, Le Kremlin Bicêtre F94275, France [4]Univ Paris 12, Service Biochimie et Génétique, Plateforme de Génomique, Créteil, France [5]INSERM, IMRB 955, Hopital Henri Mondor, Créteil, France [6]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Le Kremlin Bicêtre F-94275, France [7]Service d'Histologie et embryologie et cytogénétique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hopital Antoine Beclère, Paris, France [8]Service d'exploration fonctionnelles endocriniennes, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hopital Trousseau, Univ Pierre et Marie Curie, Paris, France

*Correspondence address. Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction or to Anne Guiochon-Mantel, Service de Génétique moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, both at Hôpital Bicêtre, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France. E-mail: jacques.young@bct.aphp.fr; anne.mantel@bct.aphp.fr

Submitted on November 20, 2011; resubmitted on December 27, 2011; accepted on January 12, 2012

BACKGROUND: Kallmann syndrome (KS) is a genetic disorder associating pubertal failure with congenitally absent or impaired sense of smell. KS is related to defective neuronal development affecting both the migration of olfactory nerve endings and GnRH neurons. The discovery of several genetic mutations responsible for KS led to the identification of signaling pathways involved in these processes, but the mutations so far identified account for only 30% of cases of KS. Here, we attempted to identify new genes responsible for KS by using a pan-genomic approach.

METHODS: From a cohort of 120 KS patients, we selected 48 propositi with no mutations in known KS genes. They were analyzed by comparative genomic hybridization array, using Agilent 105K oligonucleotide chips with a mean resolution of 50 kb.

RESULTS: One propositus was found to have a heterozygous deletion of 213 kb at locus 7q21.11, confirmed by real-time qPCR, deleting 11 of the 17 *SEMA3A* exons. This deletion cosegregated in the propositus' family with the KS phenotype, that was transmitted in autosomal dominant fashion and was not associated with other neurological or non-neurological clinical disorders. *SEMA3A* codes for semaphorin 3A, a protein that interacts with neuropilins. Mice lacking semaphorin 3A expression have been showed to have a Kallmann-like phenotype.

CONCLUSIONS: *SEMA3A* is therefore a new gene whose loss-of-function is involved in KS. These findings validate the specific role of semaphorin 3A in the development of the olfactory system and in neuronal control of puberty in humans.

Key words: puberty / Kallmann / hypogonadotropic hypogonadism / GnRH / neuropilin / semaphorin 3A

Introduction

In mammals, GnRH secretion by hypothalamic neurons is a crucial element of the reproductive cascade, triggering the release of pituitary gonadotrophins, gonadal sex-steroid secretion, pubertal development and gametogenesis (Bouligand *et al.*, 2010). Congenital hypogonadotropic hypogonadism (CHH) results from abnormal gonadotrophin secretion and is characterized by complete or partial pubertal failure (Brioude *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2011). CHH is mainly due to defective GnRH production or release by the hypothalamus or to

© The Author 2012. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society of Human Reproduction and Embryology. All rights reserved.
For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Downloaded from http://humrep.oxfordjournals.org/ at INSERM on March 15, 2012

defective GnRH-receptor function in the pituitary (de Roux et al., 1997; Bouligand et al., 2009, 2010; Brioude et al., 2010; Mitchell et al., 2011). When CHH is associated with anosmia or hyposmia, it is known as Kallmann syndrome (KS, MIM 308700, 147950, 244200, 610628, 612370, 612702) (Dodé and Hardelin, 2010; Mitchell et al., 2011). This form of CHH is due to developmental failure of GnRH neuron migration along olfactory axonal projections during fetal life (Schwanzel-Fukuda et al., 1989; Teixeira et al., 2010). *KAL1* (MIM 308700), the gene responsible for the X-linked form, was identified 20 years ago (Legouis et al., 1991), leading to the identification of the first known factor in this developmental process. In the last 10 years, loss-of-function mutations in the genes encoding fibroblast growth factor receptor 1, *FGFR1* (MIM 136350) (Dodé et al., 2003; Salenave et al., 2008), fibroblast growth factor 8, *FGF8* (MIM 600483) (Falardeau et al., 2008; Trarbach et al., 2010), prokineticin 2, *PROK2*, (MIM 607002) and prokineticin receptor 2, *PROKR2*, (MIM 607123) (Dodé et al., 2006; Sarfati et al., 2010), *CHD7* (MIM 608892) (Kim et al., 2008) and *WRD11* (MIM 606417) (Kim et al., 2010) have been shown to cause several autosomal forms of the syndrome. However, these seven genes are mutated in fewer than 30% of KS patients (Dodé and Hardelin, 2010; Mitchell et al., 2011), indicating that other responsible genes remain to be discovered.

Identification of genes responsible for KS has led to the identification of unexpected factors and neuronal signaling pathways (Legouis et al., 1991; Dodé et al., 2003) involved in the development of the olfactory system and GnRH neurons, and has extended to humans the role of signaling pathways discovered in murine models (Ng et al., 2005; Dodé et al., 2006; Matsumoto et al., 2006; Pitteloud et al., 2007).

Several genes involved in KS have been identified through the detection of deletions (Legouis et al., 1991; Hardelin et al., 1993; Dodé et al., 2003). Here we used a pan-genomic approach (Miecznikowski et al., 2011) to detect such microrearrangements and thus to identify new genes involved in KS.

Materials and Methods

The study was approved by the Paris Sud University Hospital ethics committee and complied with human research guidelines as stated in the Declaration of Helsinki. All the patients gave their written informed consent before genetic analysis and hormone studies.

From a cohort of 120 patients with KS, we selected 48 patients (44 men and 4 women) with no mutations in known responsible genes and with no chromosomal anomalies on standard karyotyping. Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes of the patients (Bouligand et al., 2009) and a reference male subject, and was labeled respectively with Cy5-dUTP and Cy3-dUTP. The Agilent 105A human oligonucleotide array (Agilent, Santa Clara, CA, USA) was used to detect chromosomal microabnormalities in the patients. All microarray and data analyses were performed according to the manufacturer's instructions. The microarrays were scanned with an Agilent microarray scanner. Captured images were processed with Feature Extraction 10.7.3.1 software and data were analyzed with Genomics Workbench 5.0 (Agilent Technology). Copy-number variations were considered significant if they were defined by three or more oligonucleotides spanning at least 50 kb, contained at least one gene, and were not listed in the Database of Genomic Variants (Miecznikowski et al., 2011) and in the French BACH genomic database. Finally, we studied 520 subjects without KS with the same comparative genomic hybridization (CGH) array chip as used in this family.

Quantitative PCR

We used real-time qPCR to test the relative copy number of SEMA3A. Primers (Supplementary data, Table SI) were designed using the third version of Primer Express (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA). Albumin exon 12 was used as genomic reference. All the primers were controlled using BLAST on the NCBI website, using the Human Genomic Plus Transcript database (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Amplifications were performed using a 7900HT Applied Biosystems™ real-time thermal cycler (Applied Biosystems™).

Reactions were performed in a final volume of 20 μl containing 10 μl Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™), 1 μl of forward primer and 1 μl of reverse primer (final concentration 500 nM) and 8 μl of DNA at 1 ng/μl solution in pure water (8 ng of tested DNA per well). Amplification was performed as recommended by Applied Biosystems™. The PCR program was started with 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, followed by 50 cycles consisting of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Dissociations curves, 95°C for 15 s, 60°C for 15 s and 95°C 15 s, were performed at the end of each run to control the specificity of the amplification with the presence of a unique and reproducible melting temperature. Standards curves, with various genomic DNA amount per well from 0.8 to 80 ng, were generated for each amplicon. These standards curves define the relation between the input DNA amount and the C_t value, i.e. number of cycles to reach the significant threshold of fluorescence. For each standard curve, PCR efficiency (E) and linear regression coefficient (R^2) were determined. Experiments were validated for each standard curve when E was $\geq$90% and R^2 was $\geq$0.95.

SEMA3A sequencing

Genomic DNA was extracted from white blood cells. The entire *SEMA3A* coding region (exons 1–17) and intron–exon junctions were amplified and sequenced with primers described in Supplementary data, Table SI. PCR and sequencing products were purified on a Biomek® NXP-96 Laboratory Automation Workstation (Beckman Coulter, Villepinte, France) with Agencourt Ampure XP® and Agencourt Cleanseq® (Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA, USA). Sequencing products were analyzed with an automated capillary sequencer (ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems™). Electropherogram-derived sequences were compared with NCBI references for the SEMA3A gene (NG_011489.1Ref SeqGene and NM_006080.2 transcript).

Results

SEMA3A deletion in a family with KS

In one KS propositus (Subject III-2 in Fig. 1A and Table I), we detected a heterozygous deletion of 213 kb at the 7q21.11 locus, removing the last 11 of the 17 *SEMA3A* exons (MIM 603961) (Fig. 1B). This heterozygous deletion was confirmed by quantitative real-time PCR with two primer pairs located in exons 10 and 15 (Fig. 1C). Real-time PCR showed the same *SEMA3A* deletion in the heterozygous state (Fig. 1C) in two KS-affected relatives of the propositus (Fig. 1A, Subjects II-2 and III-1), showing that this *SEMA3A* deletion cosegregated with the KS phenotype. In addition, we sequenced the non-deleted *SEMA3A* allele and found no mutation. Finally, this 7q21.11 deletion

Downloaded from http://humrep.oxfordjournals.org/ at INSERM on March 15, 2012

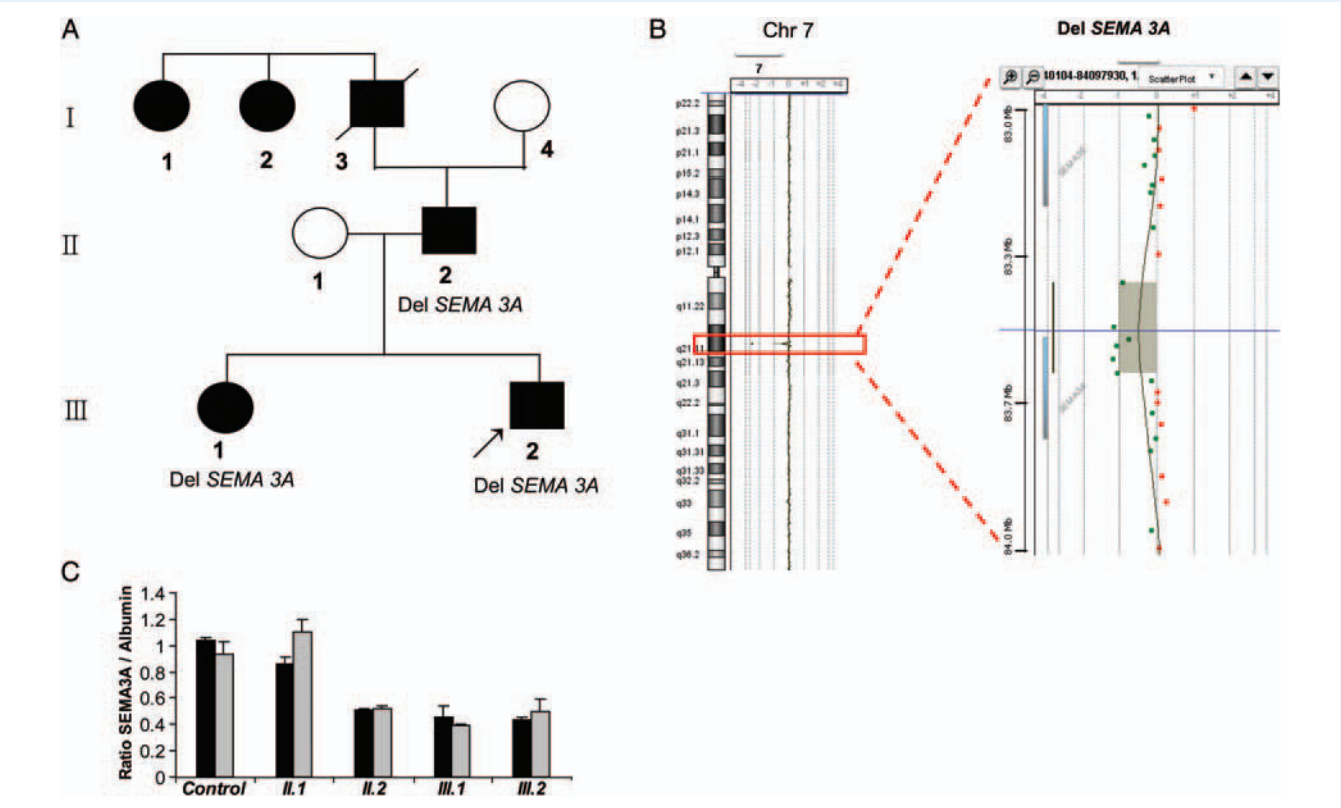


Figure 1 SEMA3A deletion in a kindred with KS. (**A**) Pedigree of the family with heterozygous *SEMA3A* deletion. The proband is Subject III-2 (arrow). The affected father (II-2) and sister (III-1) are also heterozygous for the same deletion. Solid symbols indicate clinically affected subjects. Circles represent female family members and squares male family members. (**B**) Array-CGH graphical overview of the 7q21.11 deletion encompassing the last 11 exons of the *SEMA3A* gene. (**C**) Quantitative PCR validation of the *SEMA3A* heterozygous deletion. The black column indicates exon 10 and the gray column exon 15, deleted in Subjects II-2, III-1 and III-2 (see Fig. 1A). Results are means ± SD of three independent experiments.

was not detected in 520 control subjects without KS evaluated with the same CGH array chip as in this family.

We also found 14 others copy number variations in the cohort studied that did not cosegregate with the KS and/or did not included either encoding gene regions or relevant genes (Supplementary data, Table SII).

Phenotype associated with *SEMA3A* deletion

The propositus of this non-consanguineous family had consulted for pubertal failure at age 17. Physical examination showed features of complete hypogonadism, with a mean testicular volume of 2.5 ml (normal range 12–30 ml). He also had right cryptorchidism but not micropenis (Table I). His height was 167 cm and his weight 63 kg.

Olfactometry (Massin *et al.*, 2003) showed hyposmia. Mirror movements, neurogenic deafness and midline abnormalities were absent (Dodé and Hardelin, 2010). The detailed neurological examination showed no other anomalies (pyramidal syndrome, cerebellar syndrome, sensory or ophthalmological disorders, etc.). His intelligence quotient was normal. Magnetic resonance imaging (MRI) of the olfactory bulbs showed bilateral hypoplasia. MRI of the hypothalamus, pituitary and brain was normal. Computed tomography of the semicircular canals (Jongmans *et al.*, 2009) was normal. The ocular fundus was normal. No bone abnormalities were found at radiography. Ultrasonography showed two normal kidneys. Echocardiography and cardiac auscultation were normal.

Laboratory tests showed a normal ferritin level and normal transferrin saturation coefficient. The serum testosterone, LH and FSH levels were very low, and the two gonadotrophins responded only weakly to GnRH challenge (Table I).

The sister of the propositus consulted at age 18 years for primary amenorrhea and pubertal failure (Tanner breast stage 1). Hormone assays showed a very low serum estradiol (E_2) level (Bry-Gauillard *et al.*, 2010; Shaw *et al.*, 2011), as well as low LH and FSH levels (Table I). Estrogen-progestin combination therapy induced normal breast development and menses. On re-examination at age 23 years, 6 months after withdrawal of hormone therapy, amenorrhea had recurred and E_2 and gonadotrophins levels were still very low (E_2: 8 pg/ml; LH: 0.6 IU/l; FSH: 0.9 IU/l, for normal values, see Table I).

The father of the propositus had been seen initially at 19 years in the Endocrinology and Reproductive Health Department of Bicêtre Hôpital in 1985 for pubertal failure associated with hypogonadotrophic hypogonadism and hyposmia. His testosterone and gonadotrophin levels were very low at that time (Table I). At the age of 21 years, he received a 3-week course of subcutaneous pulsatile GnRH administered via a pump (5 μg/pulse every 60 min). His gonadotrophin and testosterone levels normalized on this treatment (LH: 4.2 IU/l; FSH: 3.9 IU/l; testosterone: 4.6 ng/ml, for normal values see Table I),

Downloaded from http://humrep.oxfordjournals.org/ at INSERM on March 15, 2012

Table I Clinical and hormonal characteristics of the three kindred with a SEMA3A deletion.

Subject (see Fig. 1A)	II-2	III-1	III-2
Sex/age at diagnosis (years)	M/19	F/18	M/17
Height (cm)/weight (kg)	193/103	178/70	167/63
Reproductive phenotype at diagnosis	Hypogonadism Penis: 6 cm Mean TV: 4 ml	Primary amenorrhea, absent breast development (S1)	Hypogonadism Penis: 5 cm Mean TV: 2.5 ml Right cryptorchidism
Sense of smell[a]	Hyposmia	Anosmia	Hyposmia
Mirror movements	No	No	No
Midline defects[b], hearing loss, ptosis	No	No	No
Testosterone (T^c: ng/ml)/estradiol (E_2^c: pg/ml)[c]	0.15/–	–/7	0.12/–
FSH[c] (IU/l) basal→stimulated[d]	1.2→2.8	1.1→2.5	0.5→2.6
LH[c] (IU/l) basal→stimulated[d]	0.9→3.8	0.1→2.2	0.2→2.4
Other anterior pituitary dysfunctions[e]	No	No	No
Encephalic MRI (corpus callosum, cerebelum)	Normal	Normal	Normal
Kidney sonography	Normal	Normal	Normal
Olfactory bulbs MRI	Bilateral hypoplasia	Bilateral aplasia	Bilateral hypoplasia

M, male; F, female; TV, mean testicular volume; MRI, magnetic resonance imaging.
[a]Olfactometry as reported in Pitteloud et al. (2007).
[b]Cleft palate or lip, arquate, cleft lip.
[c]Normal range in adults, basal LH: 2.8–7.1 IU/l; basal FSH: 2.4–7.0 IU/l; testosterone in men: 2.8–9.0 ng/ml; E_2 in woman: 24–90 pg/ml (early follicular phase).
[d]GnRH :100 μg intravenous.
[e]Normal cortisol and growth hormone (GH) under hypoglycemia challenge test. Normal free T4 and TSH, normal prolactin.
–, not done.

showing that pituitary gonadotrophin secretory deficiency was linked to GnRH deficiency. Androgen therapy (testosterone enanthate, 250 mg every 3 weeks, intramuscular injections) was then started, leading to satisfactory virilization. Five years later, his testicular volume was still low (6 ml) and he was azoospermic. As he wished to have children, he was treated with hMG (150 IU twice a week) and hCG (1500 IU twice a week), leading to an increase in testicular volume and induction of spermatogenesis after 12 months of treatment. His partner became pregnant twice, giving birth to the propositus (Subject III-2) and his sister (Subject III-1).

Subject II-2 was seen again at age 54 years, 6 months after he had decided to stop testosterone enanthate therapy. His testicular volume was still low, as were his testosterone and gonadotrophin levels (testosterone: 0.6 ng/ml; LH: 0.7 IU/l; FSH: 1.3 IU/l, for normal values, see Table I).

Other pituitary functions were normal in all three affected subjects [cortisol and growth hormone (GH) on insulin-induced hypoglycemia, prolactin, free T4 and thyroid-stimulating hormone] (Table I).

Family interviews revealed the existence of anosmia, absent pubertal development and infertility in two paternal aunts of Subject II-2 (Fig. 1A) and isolated hyposmia in his deceased father who had puberty at normal age, normal sexuality and conceived without any medical assistance. KS in this family therefore appears to be transmitted in autosomal dominant manner with variable penetrance.

The standard karyotype was normal in all the KS-affected members of this family, and no additional mutations in *KAL1*, *FGFR1*, *FGF8*, *PROK2*, *PROKR2*, *CHD7*, *WDR11* (Legouis et al., 1991; Dodé et al., 2003, 2006; Falardeau et al., 2008; Kim et al., 2008, 2010; Sarfati et al., 2010; Trarbach et al., 2010), *GNRH1*, *GNRHR1*, *KISS1R*, *TAC3* or *TACR3* (de Roux et al., 1997; Bouligand et al., 2009; Topaloglu et al., 2009; Young et al., 2010; Nimri et al., 2011) were detected by sequencing.

Discussion

We describe here a heterozygous deletion that removes 11 of the 17 exons of the *SEMA3A* gene and cosegregates with the Kallmann phenotype in a non-consanguineous family. This cosegregation strongly suggests a role of this deletion in the patients' phenotype, and is compatible with a recent report that suppression of the murine ortholog of *SEMA3A* results in a phenotype similar to that of KS patients (Cariboni et al., 2011). Semaphorin 3A is a membrane-associated secreted protein that has chemorepulsive properties for neuropilin-1 expressing axons (Schwarting et al., 2000; Cariboni et al., 2011). Semaphorin 3A contains 771 amino-acids and interacts with neuropilin, which is a crucial step for interaction with plexin, a protein necessary for the signal transduction within the cell (Cariboni et al., 2011). The deletion reported here removes exons 7–17 which encode the semaphorin 3A domains involved in these interactions. *Sema3A* knockout mice exhibit not only abnormal olfactory bulb innervation (Schwarting et al., 2000; Cariboni et al., 2011) but also altered development of GnRH neurons, leading to hypogonadism (Cariboni et al., 2011). In this animal model, GnRH neurons accumulate above the cribriform plate (Cariboni et al., 2011), as also previously described in human Kallmann fetuses (Schwanzel-Fukuda et al., 1989; Teixeira et al., 2010). In line with this murine model, re-establishment of

Downloaded from http://humrep.oxfordjournals.org/ at INSERM on March 15, 2012

pituitary gonadotrophin secretion after pulsatile administration of exogenous GnRH to Subject II-2 of the family described here shows that CHH in this genetic form of KS is linked to GnRH deficiency, as in other genetic forms of KS (Salenave *et al*., 2008). Thus, in patients with *SEMA3A* deletions, as in sema 3A −/− mice, semaphorin signaling alteration could lead to abnormal migration of GnRH neurons to the hypothalamus, which is the anatomical site compatible with GnRH release into the hypothalamo-pituitary portal flow. This could therefore explain the absence of stimulation of pituitary gonadotropic cells leading to hypogonadotropic hypogonadism. In KS patients with *SEMA3A* deletion, the response to exogenous GnRH also shows that the sensitivity of pituitary gonadotrope cells to GnRH is not significantly affected as in patients with others causes of GnRH deficiency (Bouligand *et al*., 2009; Brioude *et al*., 2010)

In the family reported here, the KS phenotype seems to be transmitted in autosomal dominant manner. This suggests (i) that haploinsufficiency of semaphorin 3A in humans, as reported in KS patients with *FGFR1* mutations (Dodé *et al*., 2003; Salenave *et al*., 2008), is sufficient to cause the Kallmann phenotype, contrary to model mice, in which only homozygous knock-out leads to a similar phenotype; or (ii) that there is a second genetic event, not revealed by our CGH-array approach, within the framework of digenic or oligogenic transmission (Dodé *et al*., 2006; Dodé and Hardelin, 2010; Sarfati *et al*., 2010; Sykiotis *et al*., 2010; Mitchell *et al*., 2011). This putative second event does not correspond to mutation of genes known to be involved in normosmic CHH or KS, as we screened for mutations in the coding parts of these genes in the family members, with negative results. Moreover, our pan-genomic approach revealed no deletions spanning these genes or in other genes associated with KS, such as *NELF* (Xu *et al*., 2011). This second genetic event, if it exists, may therefore consist of a point mutation in an as-yet-unidentified KS responsible gene.

Interestingly, none of the family members with KS reported here had any other clinical neurological abnormalities. This suggests that the role of semophorin 3A in neuronal migration could be restricted, in humans to the olfactory system development and GnRH neurons migration, despite its expression in other neuronal and non-neuronal structures (Schwarting *et al*., 2000; Goshima *et al*., 2002; Cariboni *et al*., 2011). This, however, needs to be confirmed by detailed phenotypic analysis of a larger number of KS patients with *SEMA3A* mutations.

Re-examination of Subject II-2 at age 54 years showed that his congenital gonadotrophin deficiency persisted. This suggests that GnRH deficiency does not appear to be reversible in this genetic form of KS, as reported in some patients with other genetic forms (Quinton *et al*., 1999; Raivio *et al*., 2007; Mitchell *et al*., 2011). Here again, studies of larger numbers of patients will be necessary to determine the prevalence of reversibility in cases of *SEMA3A* mutations.

Finally, we identified the *SEMA3A* deletion in one of 48 KS propositi, corresponding to a prevalence of 2.0%, but the precise frequency of mutations in this gene is being examined in an ongoing exhaustive analysis of point mutations and deletions in the same cohort.

In conclusion, we report cosegregation between the KS phenotype and a heterozygous *SEMA3A* deletion in a family with several affected members, clearly demonstrating the involvement of this gene in the development of the olfactory system and in the migration of GnRH neurons in humans. *SEMA3A* is therefore a novel actor necessary for the completion of human puberty and reproduction. This discovery of a new KS responsible gene will assist with genetic counseling for this syndrome that exhibits multiple modes of transmission.

Supplementary data

Supplementary data are available at http://humrep.oxfordjournals.org/.

Acknowledgements

We thank Isabelle Boucly (Bicêtre Hospital), Valérie Delattre, Valérie Ortonne, Wilfried Verbecq-Morlot (Henri Mondor Hospital) for their excellent technical assistance.

Authors' roles

J.Y., A.G.M.: study design; C.M., J.B., B.T., B.F., L.M., L.T., J.S., F.B., B.E., A.B.S. and S.B.: execution; J.Y., C.M., J.B. and S.B.: analysis; J.Y., J.B., B.T., L.T. and A.G.M.: manuscript drafting; M.G. and G.T.: critical discussion.

Funding

This work was supported in part by grants from Paris-Sud 11 University (Bonus Qualité Recherche 2009, Attractivité Univ Paris Sud 2010), INSERM KalGenopath 09-GENO-017, PHRC HYPOPROTEO P081212 and Fondation pour la Recherche Médicale. This work was supported in part by Agence Nationale de la Recherche (ANR KalGenopath 2010), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and Agence Française de Lutte Contre le Dopage (AFLD).

Conflict of interest

None declared.

References

Bouligand J, Ghervan C, Tello JA, Brailly-Tabard S, Salenave S, Chanson P, Lombès M, Millar RP, Guiochon-Mantel A, Young J. Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. *N Engl J Med* 2009;**360**:2742–2748.

Bouligand J, Ghervan C, Trabado S, Brailly-Tabard S, Guiochon-Mantel A, Young J. Genetics defects in GNRH1: a paradigm of hypothalamic congenital gonadotropin deficiency. *Brain Res* 2010;**1364**:3–9.

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

Bry-Gauillard H, Trabado S, Bouligand J, Sarfati J, Francou B, Salenave S, Chanson P, Brailly-Tabard S, Guiochon-Mantel A, Young J. Congenital hypogonadotropic hypogonadism in females: clinical spectrum, evaluation and genetics. *Ann Endocrinol (Paris)* 2010;**71**:158–162.

Cariboni A, Davidson K, Rakic S, Maggi R, Parnavelas JG, Ruhrberg C. Defective gonadotropin-releasing hormone neuron migration in mice lacking SEMA3A signalling through NRP1 and NRP2: implications for

Downloaded from http://humrep.oxfordjournals.org/ at INSERM on March 15, 2012

the aetiology of hypogonadotropic hypogonadism. *Hum Mol Genet* 2011;**20**:336–344.

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

Dodé C, Hardelin JP. Clinical genetics of Kallmann syndrome. *Ann Endocrinol (Paris)* 2010;**71**:149–157.

Dodé C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Dû N, Soussi-Yanicostas N, Coimbra RS, Delmaghani S, Compain-Nouaille S, Baverel F *et al*. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet* 2003;**33**:463–465.

Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler ML, Lespinasse J, Lienhardt-Roussie A, Mathieu M, Moerman A *et al*. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet* 2006;**2**:e175.

Falardeau J, Chung WC, Beenken A, Raivio T, Plummer L, Sidis Y, Jacobson-Dickman EE, Eliseenkova AV, Ma J, Dwyer A *et al*. Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J Clin Invest* 2008;**118**:2822–2831.

Goshima Y, Ito T, Sasaki Y, Nakamura F. Semaphorins as signals for cell repulsion and invasion. *J Clin Invest* 2002;**109**:993–998.

Hardelin JP, Levilliers J, Young J, Pholsena M, Legouis R, Kirk J, Bouloux P, Petit C, Schaison G. Xp22.3 deletions in isolated familial Kallmann's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;**76**:827–831.

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 *et al*. CHD7 mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome-the clinical overlap with CHARGE syndrome. *Clin Genet* 2009;**75**:65–71.

Kim HG, Kurth I, Lan F, Meliciani I, Wenzel W, Eom SH, Kang GB, Rosenberger G, Tekin M, Ozata M *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.

Kim HG, Ahn JW, Kurth I, Ullmann R, Kim HT, Kulharya A, Ha KS, Itokawa Y, Meliciani I, Wenzel W *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**:465–479.

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

Massin N, Pêcheux C, Eloit C, Bensimon JL, Galey J, Kuttenn F, Hardelin JP, Dodé C, Touraine P. X chromosome-linked Kallmann syndrome: clinical heterogeneity in three siblings carrying an intragenic deletion of the KAL-1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**:2003–2008.

Matsumoto S, Yamazaki C, Masumoto KH, Nagano M, Naito M, Soga T, Hiyama H, Matsumoto M, Takasaki J, Kamohara M *et al*. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**:4140–4145.

Miecznikowski JC, Gaile DP, Liu S, Shepherd L, Nowak N. A new normalizing algorithm for BAC CGH arrays with quality control metrics. *J Biomed Biotechnol* 2011;**2011**:860732.

Mitchell AL, Dwyer A, Pitteloud N, Quinton R. Genetic basis and variable phenotypic expression of Kallmann syndrome: towards a unifying theory. *Trends Endocrinol Metab* 2011;**22**:249–258.

Ng KL, Li JD, Cheng MY, Leslie FM, Lee AG, Zhou QY. Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science* 2005; **308**:1923–1927.

Nimri R, Lebenthal Y, Lazar L, Chevrier L, Phillip M, Bar M, Hernandez-Mora E, de Roux N, Gat-Yablonski G. A novel loss-of-function mutation in GPR54/KISS1R leads to hypogonadotropic hypogonadism in a highly consanguineous family. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;**96**:E536–E545.

Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW, Plummer L, Jacobson-Dickman EE, Mellon PL, Zhou QY *et al*. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;**104**:17447–17452.

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

Raivio T, Falardeau J, Dwyer A, Quinton R, Hayes FJ, Hughes VA, Cole LW, Pearce SH, Lee H, Boepple P *et al*. Reversal of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med* 2007;**357**:863–873.

Salenave S, Chanson P, Bry H, Pugeat M, Cabrol S, Carel JC, Murat A, Lecomte P, Brailly S, Hardelin JP *et al*. Kallmann's syndrome: a comparison of the reproductive phenotypes in men carrying KAL1 and FGFR1/KAL2 mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;**93**:758–763.

Sarfati J, Guiochon-Mantel A, Rondard P, Arnulf I, Garcia-Piñero A, Wolczynski S, Brailly-Tabard S, Bidet M, Ramos-Arroyo M, Mathieu M *et al*. 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* 2010;**95**:659–669.

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

Schwarting GA, Kostek C, Ahmad N, Dibble C, Pays L, Püschel AW. Semaphorin 3A is required for guidance of olfactory axons in mice. *J Neurosci* 2000;**20**:7691–7697.

Shaw ND, Seminara SB, Welt CK, Au MG, Plummer L, Hughes VA, Dwyer AA, Martin KA, Quinton R, Mericq V *et al*. Expanding the phenotype and genotype of female GnRH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;**96**:E566–E576.

Sykiotis GP, Plummer L, Hughes VA, Au M, Durrani S, Nayak-Young S, Dwyer AA, Quinton R, Hall JE, Gusella JF *et al*. Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;**107**:15140–15144.

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

Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JR, Ozbek MN *et al*. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 2009;**41**:354–358.

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

Xu N, Kim HG, Bhagavath B, Cho SG, Lee JH, Ha K, Meliciani I, Wenzel W, Podolsky RH, Chorich LP *et al*. Nasal embryonic LHRH factor (NELF) mutations in patients with normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Fertil Steril* 2011;**95**:1613–1620.

Young J, Bouligand J, Francou B, Raffin-Sanson ML, Gaillez S, Jeanpierre M, Grynberg M, Kamenicky P, Chanson P, Brailly-Tabard S *et al*. TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;**95**:2287–2295.

Downloaded from http://humrep.oxfordjournals.org/ at INSERM on March 15, 2012

Conclusion de l'article *Young et al. Hum Reprod. 2012*

Les mutations perte de fonction de *SEMA3A* entrainent un syndrome de Kallmann.

Les trois sujets atteints analysés dans la famille (le père, le frère et la sœur) sont porteurs de la délétion hétérozygote de *SEMA3A* sans autre anomalie de la séquence du deuxième allèle et, selon l'interrogatoire, une troisième génération pourrait être atteinte (le grand-père et les deux tantes paternelles). Ces observations suggèrent un mode de transmission autosomique dominant. La pénétrance est vraisemblablement incomplète comme laisse suggérer la variabilité de l'atteinte phénotypique. Les trois cas analysés montraient un phénotype Kallmann sans réversibilité du phénotype avec une anosmie chez la fille (agénésie des bulbes olfactifs en IRM) et une hyposmie chez le père et le frère (hypoplasie des bulbes olfactifs en IRM). Le grand-père présentait une hyposmie isolée, une puberté normale et une fertilité suffisante pour concevoir sans avoir eu recours à la procréation médicalement assistée. Ses sœurs présentaient quant à elles un phénotype plus sévère avec une absence de développement pubertaire, une infertilité et une anosmie.

Ces observations phénotypiques et génétiques sont en accord complet avec le modèle du KO de Sema3A chez la souris décrit en 2011 par Cariboni et al. [182]. Les animaux présentaient une innervation anormale des bulbes olfactifs, un blocage de la migration des neurones à GnRH au niveau de la lame criblée de l'ethmoïde ce qui empêche le contact des neurones GnRH avec l'hypothalamus et entraine un déficit gonadotrope. La sécrétion des gonadotrophines a pu être restaurée dans ce modèle par l'administration pulsatile exogène de GnRH.

Six mois après cette publication Hanchate et al. [183] ont publié une analyse systématique par séquençage de *SEMA3A* chez 386 patients atteints du syndrome de Kallmann parmi lesquels ont été identifiés à l'état hétérozygote une mutation par décalage du cadre de lecture et 7 variants faux-sens (2 mutations sont récurrentes) chez 24 patients. Tous les variants faux sens étaient présents dans

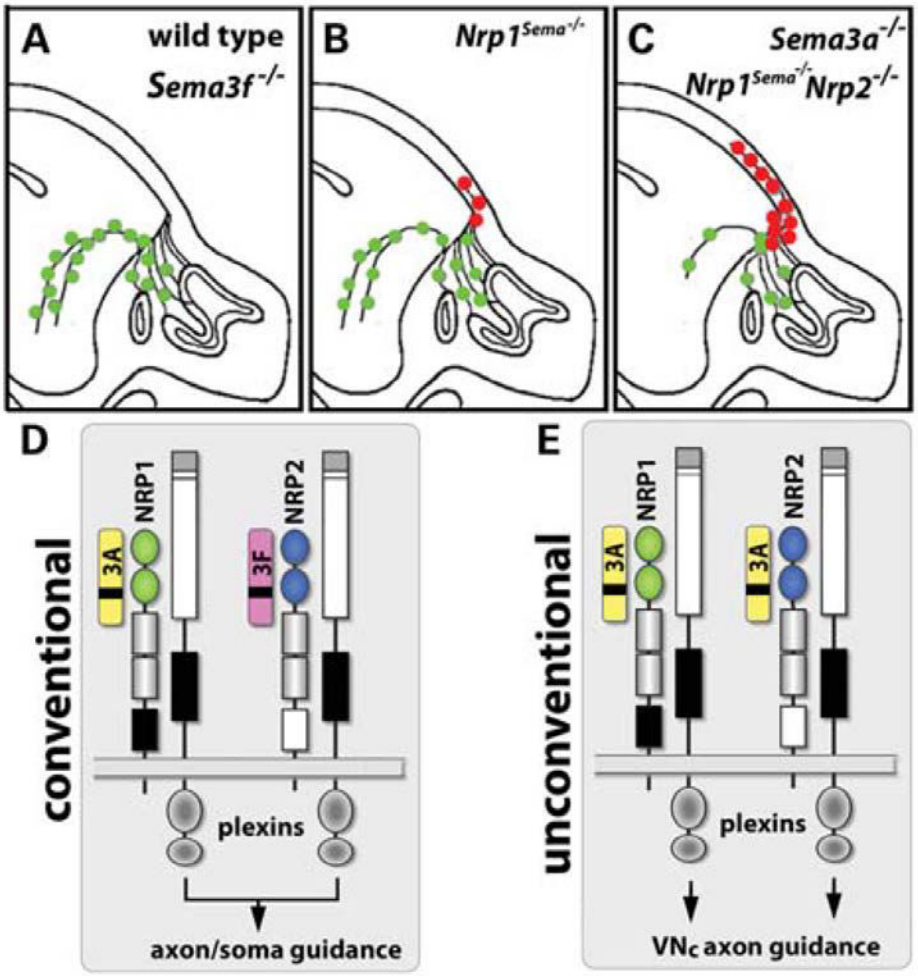


Figure 28 : Représentation schématique des neurones à GnRH et des axones voméro-nasal chez les souris sauvages et mutées.
[A, B et C] Les points verts indiquent les neurones avec migration normale et les rouges ceux avec migration ectopique.
[D et E] Illustration de différents complexes entre la plexine, la neuropiline et les sémaphorines activant différentes fonctions neuronales .

D'après Cariboni et al., Human Molecular Genetics, 2011

l'Exome Variant Server database (Exac) à une fréquence inférieure à 1,3 %. La caractérisation fonctionnelle a permis de démontrer l'absence de protéine produite par la mutation par décalage du cadre de lecture et deux des mutations faux-sens. Quatre des cinq autres mutations faux-sens montraient une incapacité à phosphoryler les protéines FAK (Focal Adhesion Kinase) et ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2) dans des cellules Gn11, modèle de neurones à GnRH, en réponse à la stimulation par la sémaphorine 3a mutée. Cinq de ces patients présentaient en plus une deuxième mutation hétérozygote dans un gène impliqué dans le syndrome de Kallmann (1 *KAL1*, 1 *FGRF1*, 2 *PROKR2* et 1 *PROK2*). La contribution réelle de chacune de ces mutations dans le phénotype n'est pas certaine en l'absence d'enquête familiale.

La contribution de mutations de *SEMA3A* au phénotype de Kallmann semble donc bien documentée par ces différents travaux mais il reste des zones d'ombre. En particulier, le mode de transmission proposé, autosomique dominant, n'est pas soutenu par le modèle murin (pas de Kallmann chez les animaux KO hétérozygotes). L'hypothèse de l'implication d'un ou plusieurs autres gènes (digénisme/oligogénisme) au cours du syndrome de Kallmann associé à des mutations de *SEMA3A* nécessite d'être approfondie.

Ces travaux sont désormais poursuivis au niveau fondamental par d'autres équipes s'intéressant aux différentes associations de ces complexes protéiques **(*Cf.* Figure 28)**.

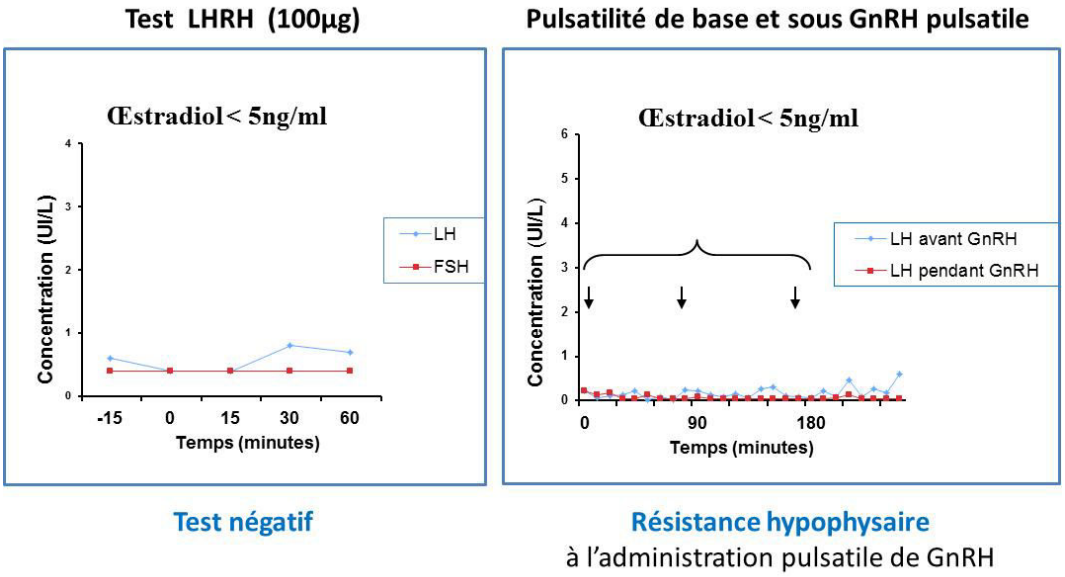


Figure 29 : Exploration dynamique de la fonction gonadotrope de la patiente 2 de la famille L… atteinte du syndrome de Boucher-Neuhauser.

Introduction Syndrome de Boucher-Neuhauser / Gordon Holmes

Contexte

Les formes syndromiques d'HHC représentent moins de 5 % des patients. En dehors des formes associées à une autre atteinte endocrinienne pour lesquelles des gènes ont été identifiés (*DAX1, PROP1*), aucun gène n'a été identifié dans les formes syndromiques alors que plusieurs familles sont déjà décrites. Elles sont donc particulièrement intéressantes d'un point de vue fondamental. De plus, l'identification d'un gène spécifique ouvre de nombreuses perspectives sur la compréhension de la physiologie.

Le Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction, du CHU de Bicêtre suit une famille atteinte d'une forme syndromique très rare d'HHC d'origine pituitaire. Cette pathologie est observée chez deux enfants au sein d'une fratrie de quatre enfants, nés de parents en bonne santé, sans consanguinité connue, bien qu'originaires de la même région. D'après la littérature des autres très rares cas publiés, le mode de transmission serait autosomique récessif **(*Cf.* Tableau 2).** L'étude de l'ensemble des gènes impliqués dans les hypogonadismes hypogonadotropes isolés n'a pas montré d'anomalie. Le but du projet était d'identifier le gène à l'origine de cette forme d'HHC.

Présentation de la famille L...

Le cas index **2** est la fille cadette de la fratrie. Elle consulte pour la première fois à l'âge de 17 ans pour absence de développement pubertaire. Elle mesure 1m60 et pèse 55kg. Le diagnostic d'hypogonadisme hypogonadotrope est posé sur le plan clinique devant un utérus de taille infantile (< 2.5 cm de hauteur) et des ovaires de petites tailles (< 3 mL). Le déficit gonadotrope est sévère avec une FSH et une LH effondrées respectivement à 0,3 et 0,2 UI/L et un œstradiol indétectable inférieur à 10 pg/mL. L'exploration dynamique de la fonction gonadotrope montrait en outre que l'origine du déficit gonadotrope était d'origine hypophysaire. En effet, ni le test d'administration de gonadolibérine, ni l'administration pulsatile prolongée sur deux semaines de fortes doses de GnRH ne parvenaient à stimuler les cellules gonadotropes hypophysaires **(*Cf.* Figure 29)**.

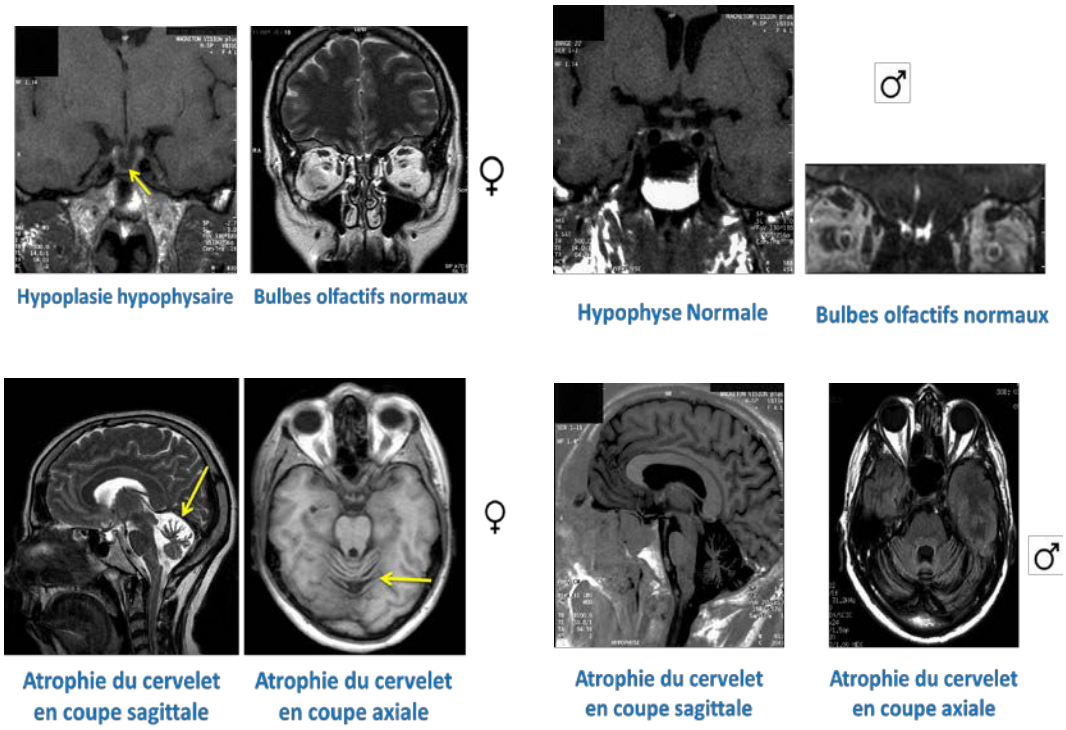


Figure 30 : Exploration cérébrale par IRM chez les patients 1 et 2 de la famille L….
En haut, IRM de l'hypophyse et des bulbes olfactifs de le patiente 2 (à gauche) et du patient 1 (à droite).
En bas, IRM du cervelet en coupe sagittale et axiale de le patiente 2 (à gauche) et du patient 1 (à droite).

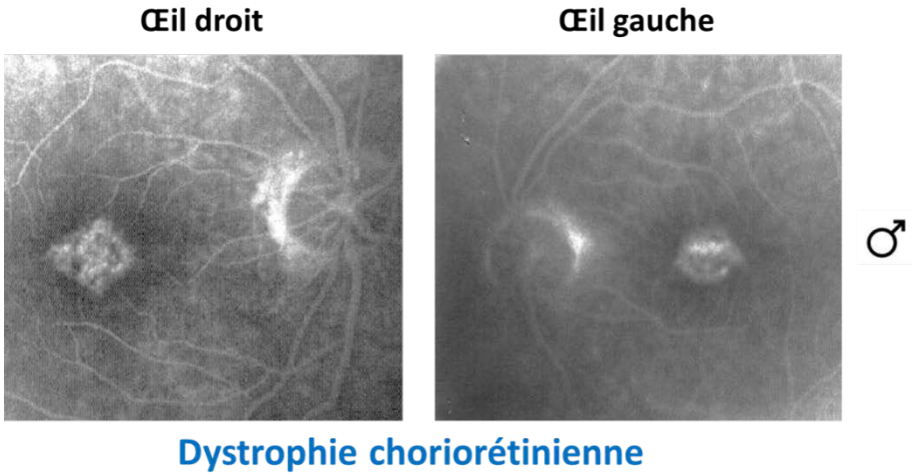


Figure 31 : Angiographie du fond d'œil du patient 1 de la famille L… atteint du syndrome de Gordon Holmes.

Les autres fonctions hypophysaires sont normales ainsi que l'olfaction. La patiente présente de plus à l'examen clinique un syndrome cérébelleux statique et cinétique d'apparition progressive depuis l'adolescence. L'IRM de l'hypophyse et des bulbes olfactifs ne montre pas de particularité. En revanche l'IRM cérébrale montre une atrophie cérébelleuse sévère **(*Cf.* Figure 30)**.

Son frère ainé **1** a consulté plus tardivement, à l'âge de 27 ans, sur les conseils de sa sœur. Il présente lui aussi une absence de développement pubertaire, mesurant 1m86 pour 68kg. Son volume testiculaire est peu important évalué à 3mL. Sur le plan biologique, FSH et LH sont très basses à 0,2 et 0,1 UI/L et sa testostérone est très basse à 0,25ng/mL. Les autres fonctions hypophysaires et l'olfaction sont normales. Tout comme sa sœur, il présente un syndrome cérébelleux statique et cinétique à l'examen clinique d'apparition progressive depuis l'adolescence. L'IRM de l'hypophyse et des bulbes olfactifs ne montre pas de particularité. En revanche l'IRM cérébrale montre une atrophie cérébelleuse sévère **(*Cf.* Figure 30)**. De façon intéressante, l'examen ophtalmologique par angiographie du fond d'œil réalisé en raison d'une myopie, a mis en évidence d'une dystrophie choriorétinienne **(*Cf.* Figure 31)**.

Les tableaux cliniques et biologiques des deux patients sont en donc en tous points comparables, associant hypogonadisme hypogonadotrope sans anosmie et syndrome cérébelleux d'apparition progressive depuis l'adolescence. La seule différence détectée est la découverte d'une dystrophie choriorétinienne chez le frère III-4, qui est non détectée chez sa sœur.

Les autres membres de la famille ne présentent aucune de ces particularités. La mort précoce de l'individu **6**, père des deux patients, est accidentelle, *a priori* sans rapport avec la pathologie des enfants. La mère et les deux frères ainés ont accepté de participer à l'enquête génétique et nous disposons ainsi des ADNs de l'ensemble des membres de la famille en dehors du père.

Auteurs	Année	Nb de cas et sexe	Consanguinité	Hypothèse de transmission	Age à l'évaluation	Type d'hypogonadisme	Début de la Neuropathie	Type de Neuropathie	Début de l'atteinte Ophtalmique	Type d'atteinte Ophtalmique	Tomodensitométrie ou IRM cérébrale
Gordon holmes	1907	3 frères et 1 sœur			?	Notion d'infertilité	33 - 40	Ataxie cérébelleuse	NR	NR	Non
Volpe et al	1963	1 homme			?	Gonatrophines urinaires effondrées	?	Ataxie cérébelleuse	NR	NR	Non
Matthews et al	1964	1 homme frère			30	Gonatrophines urinaires effondrées	30	Ataxie cérébelleuse	NR	NR	Non
		1 homme frère			?		20				
Boucher et Gibberd	1969	1 femme sœur			35	Gonatrophines urinaires effondrées	34	Ataxie cérébelleuse	4	Dystrophie choriorétienne	Non
		1 femme sœur			15		?		12		
Neuhauser et Opitz	1975	1 homme frere	oui	AR	?	Non évaluée	12	Ataxie cérébelleuse	?		Non
		1 homme frere			58	Hypogonadisme	12		?		
		1 femme sœur			53	Hypogonadisme	35		?		
		1 femme sœur			?	Hypogonadisme	12		?	Dystrophie choriorétienne	
Berciano et al	1982	1 femme sœur	oui	AR	34	HH hypothalamique ?	19	Ataxie cérébelleuse	NR	NR	Atrophie cérébelleuse
		1 homme frère			35		34	Ataxie cérébelleuse, démence			NR
Limber et al	1989	1 femme sœur		AR	32	Hypogonadisme	27	Ataxie cérébelleuse	20	Dystrophie choriorétienne	Non
		1 homme frère			15		enfance		enfance		
Fok et al	1989	1 homme frère		AR	18	HH pituitaire ?	8	Ataxie cérébelleuse	?	Dystrophie choriorétienne	Atrophie cérébelleuse
		1 femme sœur			21		10		?	?	
Schwankaus	1989	1 homme			?	Hypogonadisme	?	Ataxie cérébelleuse	NR	NR	Non
		1 homme					?				
		1 homme					?				
Abs et al	1990	1 homme	oui	AR ?	20	HH pituitaire ?	enfance	Ataxie cérébelleuse	jamais	non	Atrophie cérébelleuse
De Michele et al	1990	1 femme			30	Hypogonadisme hypogonadotrope	18	Ataxie cérébelleuse	NR	NR	Atrophie cérébelleuse
Baroncini et al	1991	1 homme frère		AR	33	HH pituitaire ?	25	Ataxie cérébelleuse	16	Dystrophie choriorétienne	Normal
		1 homme frère			31		24		6 - 30		Atrophie cérébelleuse
Erdem et al	1994	1 homme	oui		34	HH pituitaire ?	12	Ataxie cérébelleuse	12	Dystrophie choriorétienne	Atrophie cérébelleuse
Ichinose	1995	1 femme sœur	oui	AR	52	HH	20	Ataxie cérébelleuse	46	Dystrophie choriorétienne	Atrophie cérébelleuse
		1 femme sœur			57	Aménorrhée 35 ans, HH	35		?		
Salvador et al	1995	1 femme			?	Hypogonadisme pituitaire ?	28	Ataxie cérébelleuse	37	Dystrophie choriorétienne	Atrophie cérébelleuse
Rump et al	1997	1 homme frère		AR	25	HH pituitaire ?	enfance	Ataxie cérébelleuse	23	Dystrophie choriorétienne	Atrophie cérébelleuse
		1 femme sœur			21				21		
Rizzi	1998	1 homme frère		AR ?	?	Hypogonadisme	?	Ataxie cérébelleuse	?	Dystrophie choriorétienne	?
		1 homme frère									
Quinton et al	1999	1 homme			24	HH pituitaire ?	10	Ataxie cérébelleuse	Jamais	non	Atrophie cérébelleuse
Erdemoglu	2000	1 homme	oui	AR	22	HH	20	Ataxie cérébelleuse	NR		Atrophie cérébelleuse
		1 homme			21	HH	21				
		1 femme			non vue	Oligoménorrhée	15				NR
Vielhaber	2000	1 homme		AR	29	Hypogonadisme	25	Ataxie cérébelleuse	non		Atrophie cérébelleuse
Seminara	2002	1 homme frère	oui	AR	29	HH pituitaire ?	29	Ataxie cérébelleuse, deficit cognitif, démence	NR	NR	Atrophie cérébelleuse
		1 homme frère			18		22		NR	NR	
		1 femme sœur			17		30		NR	NR	
Jbour	2003	1 homme frère	oui	AR	21	HH pituitaire ?	6	Ataxie cérébelleuse	6	Retinopathie pigmentaire	Atrophie cérébelleuse
		1 homme frère			17		enfance		enfance		
		1 femme sœur			14						
Santos	2003	1 homme		AR	34	HH	?	Ataxie cérébelleuse	?	Dystrophie choriorétienne	Atrophie cérébelleuse

Tableau 2 : Tableau des cas rapportés assimilables au Syndrome de Gordon Holmes ou de Boucher – Neuhauser entre 1907 et 2003,

Diagnostic des syndromes de Gordon Holmes et de Boucher Neuhauser dans la famille L…

Cette association de signes cliniques évoque un syndrome décrit pour la première fois en 1907 par Gordon Holmes dans The Croonian Lectures [184]. Dans ce syndrome appelé le syndrome de Gordon Holmes, il est décrit l'association de l'hypogonadisme hypogonadotrope avec le syndrome cérébelleux. Deux publications plus récentes en 1969 et en 1975, par Boucher et Gibbert d'une part, et Neuhauser et Opitz d'autre part, associent ces signes cliniques à un troisième signe clinique, la dystrophie choriorétinienne. Il est très difficile d'évaluer la fréquence de ce dernier signe qui n'a pas été recherché de façon systématique dans les publications ultérieures. De ce fait il est envisageable que le syndrome de Gordon Holmes (OMIM #212840) et le syndrome de Boucher-Neuhauser (OMIM #215470) correspondent en réalité à la description plus ou moins détaillée d'une même entité nosologique. Entre 1907, la première description médicale de cette association d'HH et de symptômes cérébelleux, et 2003, seuls 40 cas ont été rapportés dans la littérature **(*cf.* Tableau 2)** [110,185–201]. Dans la famille L... le frère (**1**) correspondrait donc au diagnostic de syndrome de Boucher-Neuhauser tandis que le phénotype de la sœur est plutôt en accord avec un syndrome de Gordon Holmes. La présence de ces deux syndromes très rares au sein d'une même fratrie est un argument supplémentaire pour proposer que ces deux syndromes soit la même entité nosologique avec une présentation clinique légèrement différente du fait d'une expressivité variable au sein de la famille. Cette hypothèse est renforcée par la littérature qui décrit également des cas de démence accompagnant une aggravation de l'ataxie. Les deux patients de la famille L... ne présentent fort heureusement aucun signe de démence au cours de leur suivi médical par le service d'Endocrinologie sur une période de 25 ans. L'hypersegmentation des neutrophiles décrite dans une seule publication comme caractéristique annexe du syndrome Boucher-Neuhauser n'est pas retrouvée [198].

Stratégie d'étude génétique d'une famille présentant un Syndrome de Boucher-Neuhauser / Gordon Holmes

Exploration génétique : approche ancienne génération par séquençage de gènes candidats

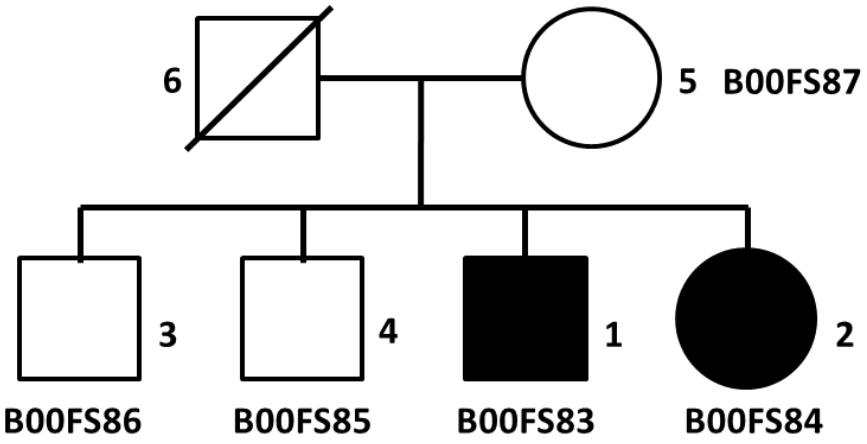
Les premières recherches de la cause génétique de la pathologie dans la famille L… ont été effectuées par le séquençage Sanger des gènes impliqués dans les hypogonadismes hypogonadotropes (*GNRHR, GNRH1, TAC3, TACR3, KISS1, KISS1R, PROK2, PROKR2 KAL1, FGFR1)* et dans les ataxies (*ATXN1, ATXN2, ATXN3, 1, FXN*). Une cytopathie mitochondriale a aussi été recherchée et exclue par différents tests biochimiques et fonctionnels. L'ensemble de ces analyses n'a pas permis d'identifier d'anomalies.

Exploration génétique : approche ancienne génération par études pan-génomiques

Une étude par CGH-array 180k a également été effectuée. Elle n'a pas permis de mettre en évidence de variation de nombre de copies < 100kb. Deux loci montraient de possibles délétions étendues (46kb en 13q21.1 et 58kb en 17q21.2) incluant 3 gènes (PCDH17, STAT5B et KCNH4). Ces deux délétions n'ont pas été confirmées par QPCR (deux couples d'amorces pour chaque locus)

Une étude par puces SNP a été effectuée sur l'ensemble des ADN de la famille à l'IGBMC de Illkirch. Ces analyses ont permis deux approches pangénomiques:

- Une recherche de zones homozygotes partagées exclusivement par les deux cas atteints selon l'hypothèse d'une consanguinité possible dans la famille avec une puce Affymetrix 250k. Cette approche permet théoriquement de rechercher des anomalies de type insertion/délétion avec une plus grande résolution que la puce CGH mais aussi indirectement des loci comprenant des mutations ponctuelles partagées par les individus atteints. Cette approche a permis de délimiter 27 zones homozygotes grâce au logiciel de représentation graphique HomoSNP [202]. Ces 27 régions contenaient 368 gènes dont 200 gènes codant une



Famille	Individu	Père	Mère	Sexe	Atteint / Sain
fam_1	ind1	ind6	ind5	1	2
fam_1	ind2	ind6	ind5	2	2
fam_1	ind3	ind6	ind5	1	1
fam_1	ind4	ind6	Ind5	1	1
fam_1	ind5	0	0	2	1
fam_1	ind6	0	0	1	1

Figure 32 : Arbre généalogique de la famille L… et exemple du fichier pedFile.pro correspondant.

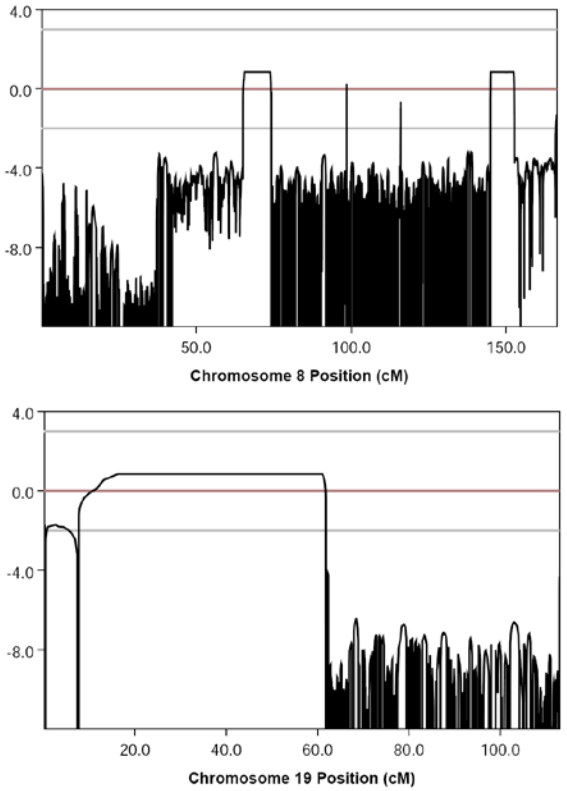


Figure 33 : Analyse de liaison de la famille L….
Aperçu des LOD score sur les chromosome 8 et 19.

protéine. L'évaluation de ces gènes a été réalisée par classification des fonctions et de l'expression tissulaire de ces gènes candidats selon les bases de données OMIM, Uniprot, Gene Atlas. Cette approche n'a pas permis de dégager de candidats forts pouvant expliquer la pathologie.

- Deux recherches de locus liés à la pathologie transmise de façon autosomique récessive selon les hypothèses alternatives : consanguinité à la génération des grands parents et sans consanguinité. Cette approche a été effectuée de la façon suivante :
    - Construction des génotypes sur Genotyping Console™ Software (création de fichier individuel .txt à partir des .cel issus de la plateforme de l'IGBMC)
    - Puis création du fichier génotype unique de la famille (.txt) et du fichier représentant l'arbre généalogique (pedfile.pro) **(*Cf.* Figure 32)**.
    - Vérification du sexe (CheckGender) et du pedfile (PedCheck) à l'aide de Alohomora [203] et création de fichiers de détection des génotypes improbables formatés pour Merlin.
    - Analyses de liaison avec Merlin [204]

En raison du faible volume d'informations apportées par la famille (deux générations et absence d'information paternelle), ces approches n'ont pas permis de détecter de liaison ayant un LOD score (logarithm of odds, logarithme des probabilités) supérieur à 2,5 **(*Cf.* Figure 33)**.

Exploration génétique : Approche Nouvelle Génération : Exome par Séquençage Haut Débit

Face à l'échec des premières approches, nous avons établi une collaboration avec le Centre National de Génotypage (CNG Dr. Jean François Deleuze et M. Vincent Meyer) afin de réaliser le séquençage des exomes des ADNs de cette famille. Les banques d'ADN ont été préparées par capture à l'aide du kit TruSeq Exome et séquencé sur Illumina HiSeq. Le traitement bioinformatique comprenait le démultiplexage, le trimming ou troncation des extrémités de mauvaise qualité de chaque séquence, l'alignement sur le génome hg19 et la génération de fichiers de variants par individu. Ce traitement bioinformatique a été réalisé par Vincent Meyer au CNG. Cette approche a identifié plus de 10 000 variants par individus séquencés compilés dans un fichier par individu au format .vcf (variant calling format).

Avec l'appui de la plateforme de bioinformatique du génoscope où ont été hébergées les données, nous avons écarté les variants de mauvaise qualité et de profondeur de lecture inférieure à 10X et les variants fréquents (> 2%) compte tenu de la prévalence de la maladie. L'annotation des gènes a été effectuée avec SNPeff [205].

Nous avons tout d'abord vérifié l'absence de variants pathogènes sur les gènes connus dans les HH et les ataxies cérébelleuses. Comme lors de l'analyse Sanger, nous n'avons pas retrouvé de variants délétères.

Ensuite nous avons testé l'hypothèse homozygote et identifié 7810 variants communs aux deux individus atteints et absents à l'état homozygote chez les apparentés. Trente-trois étaient situés dans les régions codantes ou flanquantes (+/-20 nucléotides en amont ou en aval des exons) et absents des bases de données. Aucun de ces variants ne correspondait à des gènes dont la fonction ou l'expression en faisait un candidat évident pour la pathologie.

Puis, nous avons testé l'hypothèse d'hétérozygotie composite pour un même gène chez les deux individus atteints: nous avons établi d'une part la liste des variations

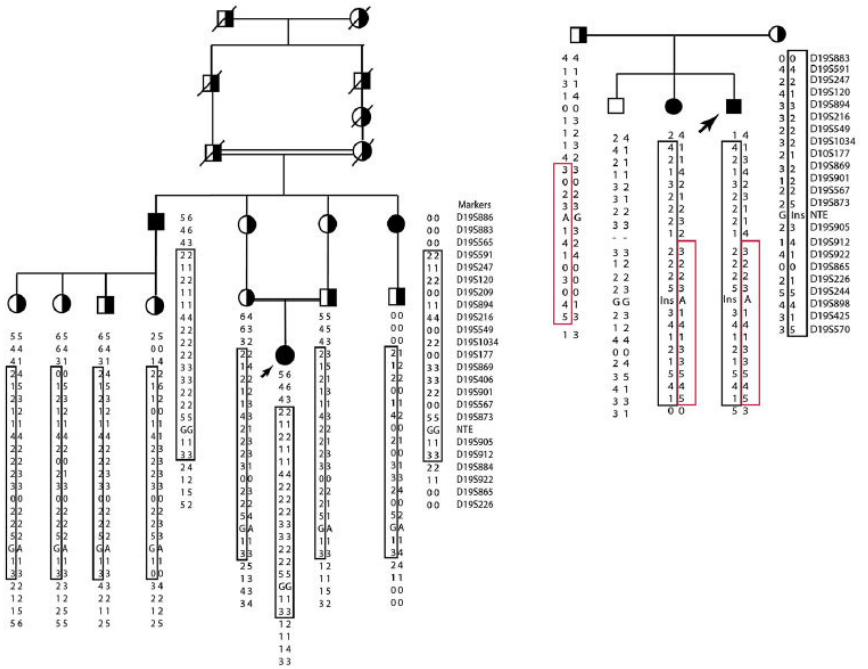


Figure 34: Familles et analyses de liaison par marqueurs microsatellites ayant permis l'identification de mutations de *PNPLA6* dans les paraplésies spastiques.
Les individus atteints sont hétérozygotes composites pour des mutations de *PNPLA6.*

D'après Rainier et al., The American Journal of Human Genetics,2008

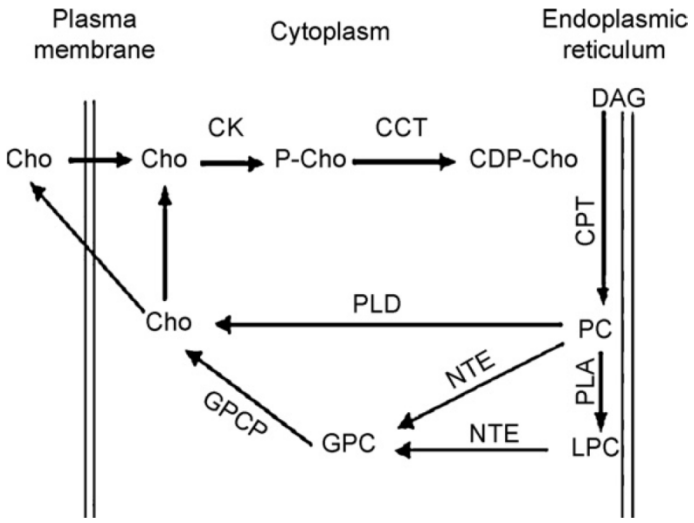


Figure 35 : Voie métabolique de la Neuropathy Target Esterase dans le métabolisme de la phosphatidylcholine.
Au niveau du réticulum, la phosphatidylcholine (PC) associée à la membrane peut être hydrolysée par la phospholipase D pour former de l'acide phosphatidique et de la choline (Cho). PC peut également être désacétylé par la Neuropathy Target Esterase (NTE) pour former deux formes solubles dans le cytoplasme : des acides gras libres et la glycérophosphocholine (GPC). De plus la phospholipase A et la NTE peuvent désacetyler séquentiellement PC vers GPC en formant un intermédiaire lysophosphatidycholine (LPC). GPC est hydrolysé par la glycérophosphorylcholine phosphodiestérase (GPCP) en Cho et glycérophosphate. Cho peut être phosphorylée et sécrétée hors de la cellule.

D'après W.-Y. Hou et al., Toxicology, 2008

rares (<1%) et prédites comme délétères pour au moins un transcrit (base Ensembl) communes aux deux individus atteints et à leur mère. D'autre part la liste des variants « paternels » *i.e*. communs aux deux malades et absents chez leur mère selon les mêmes modalités. Le croisement des listes retrouve 30 gènes correspondant à 89 variations chez la mère et 69 chez le père. De cette dernière liste non plus, aucun candidat évident n'a pu être identifié.

Identification d'un gène responsable de paraplégies spastiques, d'ataxie, de syndrome de Gordon Holmes et Boucher-Neuhauser par d'autres équipes.

En 2014 sont publiés coup sur coup deux articles identifiant des mutations du gène *PNPLA6* (Patatin like domain containing 6) dans les syndromes de Gordon Holmes et de Boucher-Neuhauser (BNS) [206,207].

Ce grand gène de 37 exons situé sur le bras court du chromosome 19 (19p13) était connu depuis 2008 pour provoquer, en cas de mutation perte de fonction, des paraplégies spastiques selon un mode de transmission autosomique récessif [208]. Il possède cinq transcrits alternatifs principaux. Son identification dans cette pathologie avait été permise par analyse de liaison de marqueurs microsatellites dans deux familles à cas multiples avec consanguinité. Aucune description de troubles endocriniens n'avait été rapportée chez les patients **(*Cf.* Figure 34)**.

PNPLA6 code la Neuropathy Target Esterase (NTE), enzyme connue de longue date (1969) [209,210] comme la cible de composés organophosphorés neurotoxiques (gaz de combat sarin, pesticides) provoquant une paralysie retardée 11 à 21 jours après l'exposition. Elle a pour rôle de déacétyler la phosphatidylcholine (PC) ou la lysophosphatidylcholine (LPC) en glycérophosphocholine (GPC) et en acides gras libres **(*Cf.* Figure 35)**.

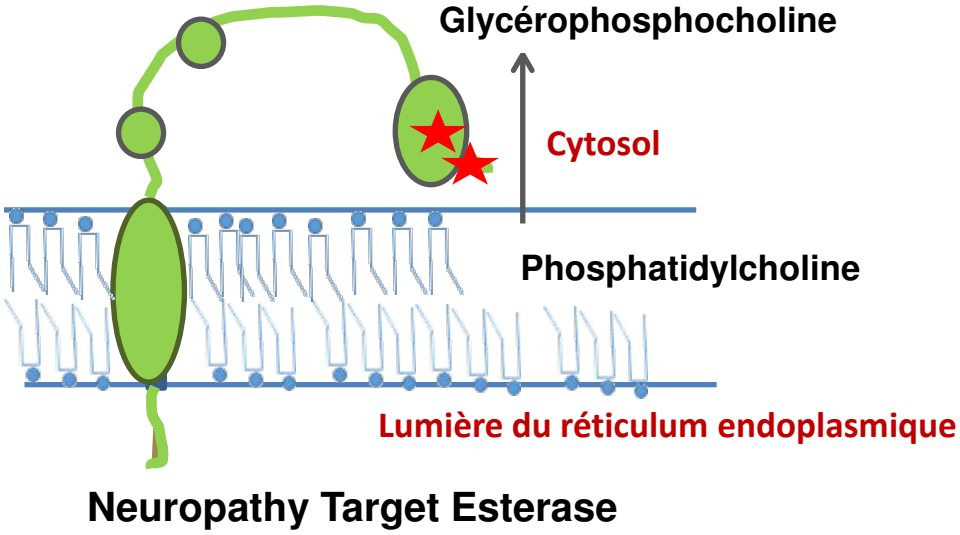


Figure 36 : Représentation schématique du fonctionnement de la NTE (Neuropathy Target Esterase) enchâssée dans la membrane du réticulum.
L'activité estérasique s'effectue du coté cytoplasmique.

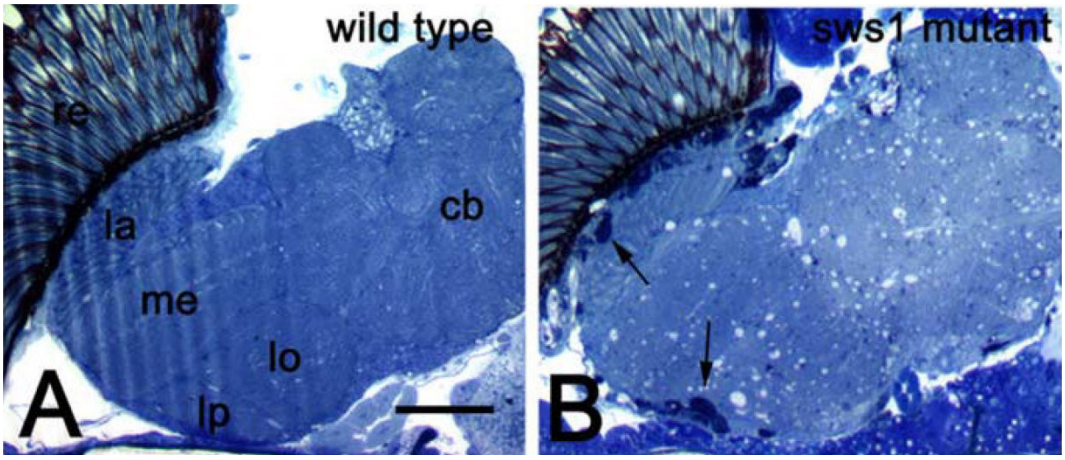


Figure 37 : Phénotype Swiss-Cheese au niveau des cellules gliales et des neurones de la drosophile sws.

D'après Mühlig-Versen et al., J Neurosci., 2005

Cette estérase située sur la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique est donc impliquée dans la voie de synthèse de la choline, précurseur de l'acétylcholine neurotransmetteur essentiel aux commandes motrices, ce qui permet d'expliquer l'implication de cette estérase dans la neurotoxicité **(*Cf.* Figure 36)**. L'expression de la NTE est quasi ubiquitaire et est notamment présente au niveau du cortex cérébral, des cellules de Purkinje du cervelet et de l'hippocampe [211]. Le modèle murin KO n'est pas viable. Un modèle KO conditionnel cerveau spécifique et des modèles naturels de mutations de la NTE chez la drosophile développent un phénotype dits « swiss-cheese ». En effet l'examen des systèmes nerveux de ces animaux montre une dégénérescence neuronale avec formation de lésions spongiformes **(*Cf.* Figure 37)**.

L'identification de mutations *PNPLA6* dans les syndromes de Gordon Holmes et de Boucher-Neuhauser est donc inattendue. Synofzik et al. décrivent quatre patients BNS et un patient GHS. Le gène *PNPLA6* a été identifié après une analyse d'exome complet chez trois patients (2 BNS et 1 GHS). Puis quatre autres patients BNS ont été analysés par séquençage Sanger. Au total, ils retrouvent 9 variants (1 faux sens à l'état homozygote et des hétérozygotes composites pour des mutations faux sens, décalage du cadre de lecture et d'épissage) [207]. De façon indépendante, Topaloglu et al. [206] ont recherché par recherche de zones d'homozygotie sur puce SNPs le locus lié au GHS dans une famille consanguine à deux cas. Trois loci homozygotes ont été identifiés. L'analyse par exome complet a permis d'identifier une mutation faux-sens à l'état homozygote dans *PNPLA6*. Le séquençage Sanger dans deux autres familles (1 BNS, 1 GHS) a permis d'identifier 4 autres mutations portées à l'état hétérozygotes composites par les patients atteints (2 faux-sens et 2 décalage du cadre de lecture).

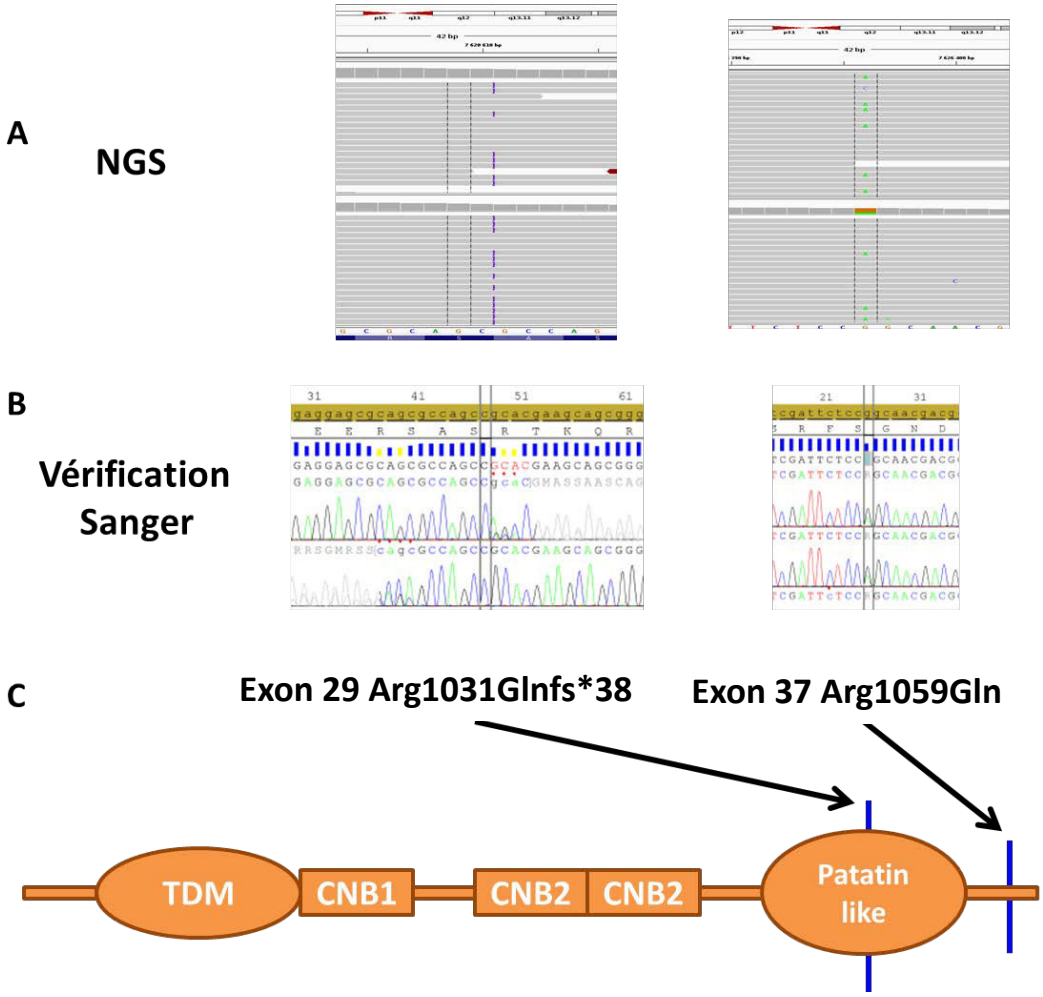


Figure 38 : Résultat des exomes de la famille L…

[A] Visualisation sur IGV (Integrative Genome Viewer) de l'alignement des séquences réalisées par NGS (Séquençage Nouvelle Génération) des individus 1 et 2 de la famille L…

A gauche, le pointillé violet correspondant à l'insertion de 4 nucléotides chez les deux patients dans l'exon 29.

A droite, les A de couleur verte correspondent à la substitution hétérozygote de la guanine 4076 par une adénine.

[B] Vérification par séquençage Sanger des deux variants des exons 29 et 37 de *PNPLA6* chez l'ensemble des membres de la familles (sur l'image seul l'individu 1 est représenté).

[C] Représentation schématique de la structure protéique de la NTE codé par *PNPLA6* et positionnement des mutations (en bleu).

Résultats Syndrome de Boucher-Neuhauser / Gordon Holmes

Suite à ces publications et à la lumière de l'identification de ce nouveau gène, nous avons examiné de nouveau nos données d'exome de la famille L… à la recherche de variants de *PNPLA6*. Ce gène n'est pas inclus dans la liste de variants candidats dans l'hypothèse homozygote. En revanche, nous avons pu retrouver à partir de listes de variants issus de la sélection des 30 gènes ayant des événements hétérozygotes composites, 2 variants de PNPLA6 chez les malades. Ces variants ont été vérifiés par séquençage Sanger **(*Cf.* Figure 38)**.

Le variant d'origine maternel est une duplication de 4 nucléotides dans l'exon 29 du transcrit NM_001166111.1 provoquant un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré 38 acides aminé en aval du transcrit, dans l'exon 30 (c.3088_3091dup, p.Arg1031Glnfs*38). Ce codon stop est situé à 39 nucléotides en amont de l'extrémité 3' de l'exon 30 et pourrait échapper au système NMD (Nonsense-Mediated Decay). La protéine serait donc produite mais tronquée d'une grande partie du domaine estérasique (EST domain). Ce variant est retrouvé à l'état hétérozygote chez tous les membres de la famille. Ce variant est très rare mais est référencé dans dbSNP (rs764267161) sans fréquence rapportée et dans la database EXAC avec une fréquence de 0,002% dans la population européenne.

Le variant, vraisemblablement d'origine paternel est une mutation faux sens dans l'exon 37 du transcrit NM_001166111.1 situé sur un nucléotide et un acide aminé faiblement conservé. (c.4076G>A, p.Arg1359Gln). Ce variant est très rare mais est référencé dans dbSNP rs368661376 sans notion de fréquence et dans EXAC à 0,02%. La distance de Grantham de 43 indique des propriétés physico chimique proches entre l'arginine et la glutamine. La prédiction *in silico* par SIFT indique une variation tolérée (score 0,36). Le logiciel Polyphen2 le prédit comme probablement délétère avec un score de 0.856 sur le transcrit NM_001166111.1 et bénin avec un score de 0.239 pour le transcrit alternatif NM_006702.4. Dans la famille, cette

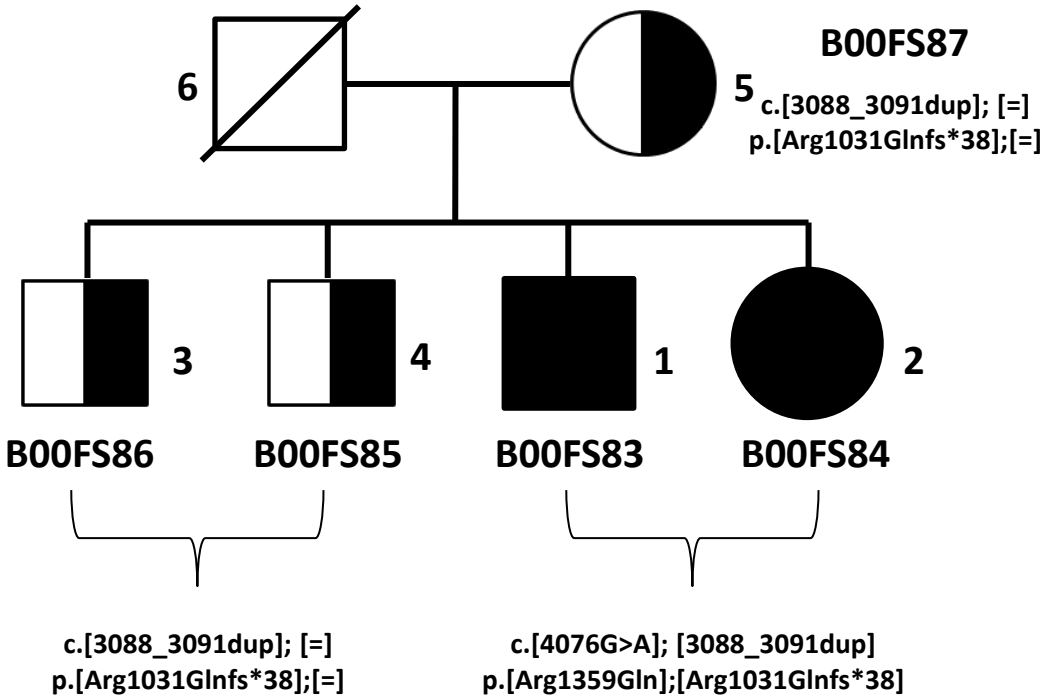


Figure 39 : Génotypage de *PNPLA6* dans la famille L…
Les individus 1 et 2 présentant respectivement le syndrome de Boucher-Neuhauser et le syndrome de Gordon Holmes. Ils sont hétérozygotes composites pour un variant faux-sens (Arg1359Gln) et une duplication de 4 nucléotides entrainant un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré (Arg1031Glnfs*38). Les autres membres de la famille accessibles à l'analyse sont sains. Ils sont tous les trois hétérozygotes pour la duplication et ne portent pas le variant faux-sens.

variation est retrouvée exclusivement chez les deux malades. Sa présence à l'état hétérozygote chez le père n'a pu être vérifiée.

Ces variations restent les mêmes en terme de nature des acides aminés et d'épissage quel que soit le transcrit testé car les épissages alternatifs se produisent en amont de leurs positions.

La ségrégation familiale de ces variations est compatible avec les phénotypes de chacun des membres de la famille L… selon un mode de transmission autosomique récessif **(*Cf.* Figure 39)**.

Conclusion Syndrome de Boucher-Neuhauser/Gordon Holmes

Nous avons pu mettre en évidence deux variants rares de PNPLA6, gène identifié par d'autres équipes comme responsable de ces deux syndromes, chez les 2 patients atteints. Ces 2 variants sont retrouvés à l'état hétérozygote composite et la ségrégation familiale est compatible une transmission autosomique récessive, l'hypothèse de transmission la plus probable.

Le premier variant (p.Arg1031Glnfs*38) est identique à celui identifié à l'état hétérozygote composite chez un patient BNS et 1 patient GHS rapporté dans la publication de Synofzik et al. [207] (nommé alors c.3084_3085insGCCA). Ce variant pourrait être donc récurrent dans ces pathologies. Sa fréquence peut également être sous-estimée dans la population générale en raison de la difficulté relative de son séquençage par technique NGS et d'une nomenclature difficile à appliquer concernant ce type d'insertion. Le caractère délétère de ce variant est donc étayé par la prédiction de la troncation du domaine catalytique de l'enzyme et par la répétition de son identification dans ces syndromes par des équipes indépendantes chez des patients différents.

Le second variant est un variant faux sens (c.4076G>A, p.Arg1359Gln) uniquement identifié dans la famille L… . Son caractère délétère est incertain. Néanmoins Topaloglu et al. [206] ont mis en évidence une mutation faux sens du même acide aminé (c.4075C>T, p.Arg1359Trp). Ce variant faux sens est donc un bon candidat à une caractérisation fonctionnelle.

La mise en évidence de ces variants très rares de PNPLA6 chez des patients présentant ces deux syndromes très rares également viennent renforcer l'implication de ce gène dans ces pathologies. Leurs présences semblent difficilement pouvoir être fortuites. Néanmoins, le mécanisme physiopathologique par lequel des mutations de ce gène, *a priori* perte de fonction d'après les premières tentatives de caractérisation fonctionnelle, entraine une telle diversité d'atteintes de façon inconstante (paraplégies spastiques, ataxies spastiques, GHS, BNS) reste à découvrir.

Identification de nouveaux gènes par méthodes avec a priori : Gènes Candidats

Analyse de panels de gènes par NGS gènes connus et gènes candidats

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) est parfaitement adapté au diagnostic des CHH en permettant une analyse systématique des gènes identifiés dans les formes isolées ou même combinées à d'autres déficiences endocriniennes. Cette approche a été mise en œuvre dans notre laboratoire en vue du diagnostic moléculaire des CHH depuis la fin 2014. L'analyse simultanée de l'ensemble des gènes permet d'étudier la prévalence de l'oligogénisme, c'est-à-dire la responsabilité dans le phénotype CHH de la coexistence de plusieurs mutations localisées sur des gènes différents. Nous avons aussi ajouté au panel de gènes, différents gènes candidats d'après leur fonction, afin d'être en mesure d'identifier de nouvelles causes génétiques de CHH.

Matériel et méthodes

Notre "panel NGS" comprend un total de 70 gènes. L'ensemble des régions codantes ±50bp ont été analysées. Ce panel inclus l'ensemble des gènes (35 gènes) actuellement décrits comme étant impliqués dans les nCHH, dans le syndrome de Kallmann et dans les pan-hypopituitarismes. Les analyses sont réalisées sur un séquenceur Illumina MiSeq. La capture des régions cibles est réalisée par une méthode de capture par hybridation dérivée de la méthode Sureselect XT (Agilent ™) adapté d'après la publication de Castéra L et al., Eur J Human Genet 2014 [212]. L'analyse bioinformatique est réalisée sur notre propre portail intranet Galaxy en suivant les recommandations du Broad Institute (Alignement par BWA-MEM, Variant calling par GATK 3.1 et Annotations des variants par Annovar). L'approche NGS, nous assure une couverture de 98% des régions d'intérêt avec une profondeur de lecture > 30X.

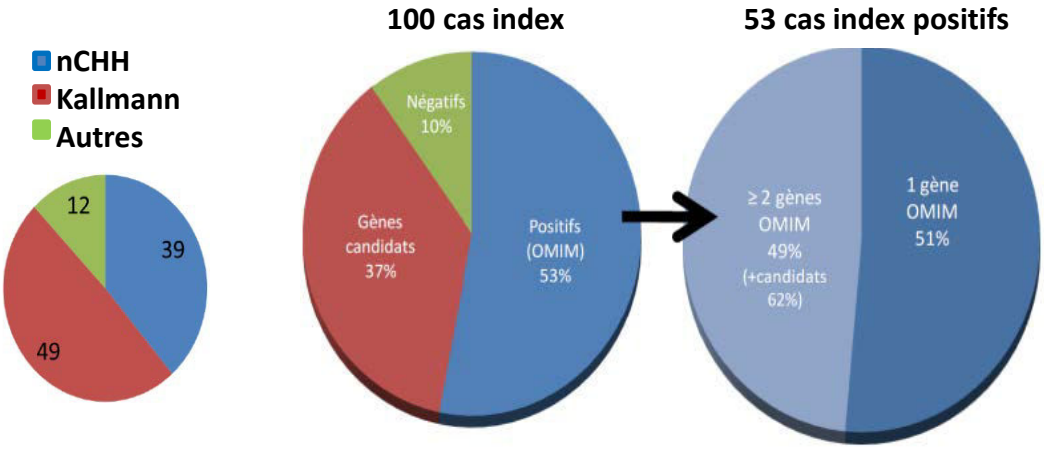


Figure 40 : Patients analysés par NGS à Bicêtre : Phénotype CHH et taux d'élucidation génétique par le panel.

D'après Francou et al., Assises de Génétique, 2016

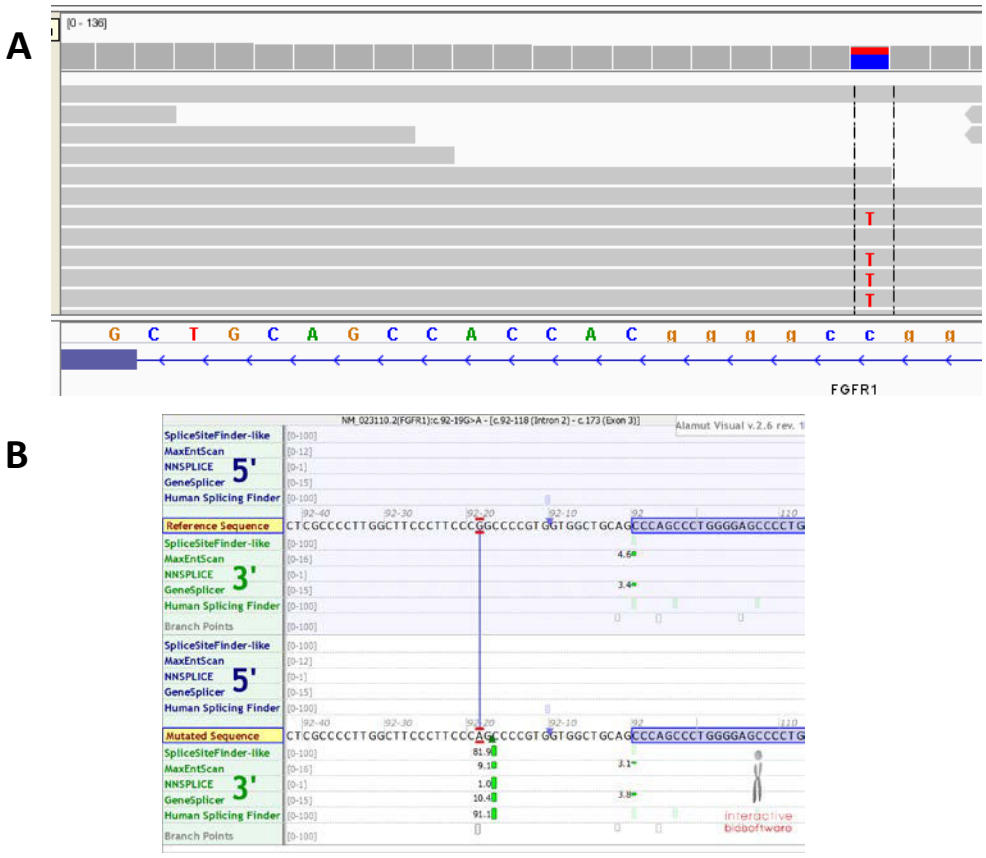


Figure 41 : Mutation intronique de FGFR1 créant un site d'épissage en amont de l'exon 2.

[A] La mutation NM_023110.2:c.92-19G>A n'était pas mis en évidence par séquençage Sanger. Elle est parfaitement identifiée à l'état hétérozygote par NGS (32 lectures de l'allèle G et 19 pour le A).

[B] La substitution c.92-19G>A est prédite par les 5 logiciels comme créant un site d'épissage en c.92-17 dont la séquence est plus proche d'un site canonique que le site accepteur d'épissage classique. La conséquence possible serait la rétention de 17 nucléotides de l'intron1 et un décalage du cadre de lecture.

D'après Francou et al., Assises de Génétique, 2016

Liste des 35 gènes testés actuellement testés (version 1 du panel) (« Gènes Classiques »):

Impliqués dans les formes isolées d'hypogonadismes hypogonadotropes : *GNRHR, GNRH1, KISS1R, KISS1, TACR3, TAC3, KAL1, FGFR1, FGF8, PROKR2, PROK2, WDR11, CHD7, SEMA3A, NSMF, HS6ST1, FSHB, LHB, SOX3, FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, FLRT3.*

Impliqués dans les formes syndromiques d'hypogonadismes hypogonadotropes : *PROP1, NR0B1, PCSK1, LHX4, HESX1, OTX2, RNF216, OTUD4, SOX2, POU1F1, SOX10*

En plus de ces gènes, 35 « gènes candidats » sont également capturés.

Résultats

L'analyse de 100 patients cas index atteints de CHH (49 SK, 39 nCHH, 12 syndromiques) a permis d'identifier des mutations ponctuelles ou des grands réarrangements probablement en lien avec le phénotype chez environ un patient sur deux. **(*cf.* Figure 40)**. Cette approche systématique nous a donc permis l'identification des causes génétiques de CHH de façon beaucoup plus rapide et efficace que par la méthode de Sanger (< 20% de patients positifs) [213].

Cette approche a permis en particulier de débloquer des dossiers très anciens qui étaient en errance diagnostique du fait du manque de puissance de l'ancienne méthodologie. C'est le cas en particulier pour une famille de Kallmann dominant pour lequel l'approche NGS a permis de mettre en évidence une mutation intronique de *FGFR1* qui crée un nouveau site accepteur d'épissage **(*cf.* Figure 41)**.

De façon intéressante, cette approche systématique nous a fait découvrir chez environ 50% des 68 patients mutés des potentiels oligogénismes concernant d'autres gènes déjà connus comme étant impliqués dans ces pathologies [213]. C'est le cas par exemple d'un patient qui était connu comme étant porteur de la mutation *GNRHR* p.(Gln106Arg) à l'état hétérozygote. Cette mutation n'était pas suffisante pour expliquer le phénotype (transmission autosomique récessive) et l'analyse NGS

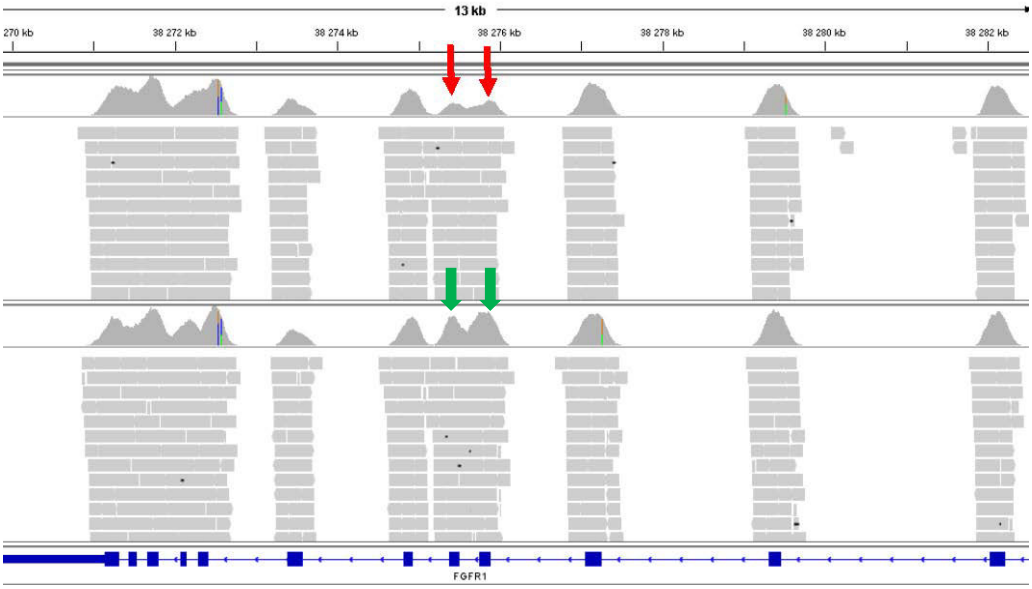


Figure 42 : Délétion hétérozygote intragénique de FGFR1 mise en évidence par NGS après capture.
Perte de profondeur de lecture (46 et 47% de lecture en moins) des exons 9 et 10 de FGFR1 (flèches rouges) comparé à un ADN sans délétion (flèches vertes)

D'après Francou et al., Assises de Génétique, 2016

a permis de mettre en évidence une délétion hétérozygote de 2 exons du gène FGFR1 **(*cf.* Figure 42)**.

L'analyse des gènes candidats est actuellement en cours. L'implication de gènes qui sont en lien avec les voies de signalisation *FGFR1* et *SEMA3A* est particulièrement intéressante.

Conclusion

Ces premiers résultats montrent une augmentation de 150% du nombre de patients pour lesquels nous mettons en évidence des variants pouvant expliquer un CHH (passage de 20% à 53% de patients avec mutations sur les gènes connus). Cette spectaculaire augmentation est notamment expliquée par l'élargissement du nombre de gènes analysés (de 10 à 35 gènes). Vingt-cinq gènes n'étaient pas auparavant analysés en Sanger en raison de leur faible prévalence supposée ou en raison de leur taille importante (> 10 exons) rendant complexe et couteuse la mise en place de leurs analyses. Le NGS permet de surmonter ces difficultés.

De plus le NGS permet l'analyse simultanée de ces gènes et semble révéler l'importance de l'oligogénisme dans les CHH. En effet 26 patients CHH analysés présente au moins deux gènes avec des variants rares potentiellement liés à leur pathologie.

De façon très intéressante nous retrouvons, pour un grand nombre de patients (37), exclusivement des variants rares de gènes candidats. Ce résultat permet d'espérer l'identification de nouveaux gènes des CHH.

Seuls 10 malades échappent complètement aux hypothèses formulées par l'établissement de ce panel de gènes.

DISCUSSION GENERALE

Le point de départ de ce travail était de réaliser la caractérisation fonctionnelle de mutations identifiées chez des patients CHH. Cette caractérisation sert en effet plusieurs objectifs.

D'un point de vue médical immédiat, la caractérisation fonctionnelle permet de pouvoir affirmer le caractère délétère des mutations et expliquer la pathologie au patient, d'établir des corrélations phénotype / génotype et d'anticiper la prise en charge d'un patient et de sa famille à tous les âges, de calculer la prévalence des mutations de chaque gène permettant d'attribuer de façon probabiliste l'imputabilité d'un ou plusieurs gènes afin d'orienter les stratégies de diagnostic moléculaire et prévoir les modes de transmission possibles.

D'un point de vue scientifique cette caractérisation fonctionnelle permet d'améliorer la connaissance des relations structure / fonction des gènes ou des protéines étudiés afin de pouvoir prédire avec plus de fiabilité les conséquences de nouvelles mutations, d'établir de nouvelles hypothèses mécanistiques et physiopathologiques, consolider les données de la littérature de ces pathologies rares notamment sur le rôle de ces gènes dans le développement embryonnaire ou durant la minipuberté.

Les prévalences, la connaissance des modes de transmission, l'expression variable, les conséquences sur l'axe gonadotrope, endocriniennes et extra endocriniennes de chaque cause génétique permettent même en cas de résultats moléculaires incomplets, de transmettre une information médicale claire et la plus fiable possible dans le but d'un conseil génétique au patient et à sa famille en particulier dans le contexte d'un projet parental.

Prévalences

Les travaux présentés dans la première partie ont servisce dernier objectif en établissant les prévalences des événements génétiques des *TAC3*, *TACR3* et *KISS1R*

en particulier, et des autres gènes connus dans les CHH (*KAL1, FGFR1, FGF8, SEMA3, PROK2, PROKR2, GNRHR, GNRH1* et *KISS1*). Chacun de ces gènes est une cause excessivement rare de nCHH à l'exception de *FGFR1* et de *GNRHR*, qui sont les deux gènes les plus fréquemment impliqués.

Ces travaux d'établissement de prévalence sont particulièrement difficiles à réaliser en raison d'un très grands nombre de biais.

Les biais les plus difficiles à écarter sont ceux liés au recrutement des malades :

- Biais de diagnostic d'une maladie génétique rare et peu connue : diagnostic difficile à poser, aux signes inconstants, et à l'expressivité variable au sein de la famille. Certains patients sont dans une errance diagnostique depuis de nombreuses années ou ignorent simplement le fait d'être atteints de CHH,
- Biais en raison d'un traitement symptomatique accessible (le développement des caractères sexuels secondaires peut être conduit par les généralistes, gynécologues, andrologues) sans nécessité de diagnostic étiologique qui quant à lui nécessite un circuit de soins spécialisés hospitaliers, souvent éloignés du domicile des patients,
- Biais de gravité du phénotype : les patients les plus atteints sont plus demandeurs d'une prise en charge médicale et ils sont donc dirigés naturellement vers un médecin spécialisé alors que ceux présentant des phénotypes partiels échappent à ce circuit,
- Biais de genre : le diagnostic est plus difficilement posé chez les sujets féminins que ce soit à la naissance, dans l'enfance ou à l'âge adulte. Les garçons sont dépistés plus facilement et plus précocement (signes dès la naissance, attente importante des signes de virilisation à l'adolescence).

Les biais fréquemment retrouvés dans les différents études et compliquant leurs comparaisons sont inhérents au calcul de la prévalence en lui-même :

- Sur l'étendue des analyses moléculaires réalisées pour chaque patient rendant hétérogène les effectifs séquencés pour chaque gène,
- Sur le type d'événement moléculaire retenu : Variants rares ou mutations validées par ségrégation familiale et/ou par caractérisation fonctionnelle,

- Sur les patients retenus : Ceux portant des mutations expliquant le phénotype et en accord avec le mode de transmission communément admis ou bien tous les patients présentant des variants rares,
- Sur la population analysée : HH, CHH, nCHH, SK, CHH syndromique, retard pubertaire.

La description statistique présentée en fin de la première partie de ce document permet de prendre en compte cette deuxième série de biais afin de pouvoir comparer les mutations des différents gènes des nCHH de façon exhaustive selon une même méthodologie. Cette démarche n'a pour l'instant pas d'équivalent dans la littérature. Elle est permise par le rayonnement du service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction recrutant un grand nombre de cas de CHH et l'effort colossal de séquençage du laboratoire de Génétique de Bicêtre.

Perspectives ouvertes par le panel NGS des gènes CHH

Le NGS permet de s'affranchir de plusieurs de deux biais discutés ci-dessus : étendue des analyses, cohérence et systématisme des variants retenus. Il permet donc de poser plus rigoureusement la question de l'oligogénisme dans les CHH.

L'oligogénisme suggéré par l'analyse des patients atteints de CHH par le panel NGS sera toutefois difficile à établir. Sa démonstration ne pourra se faire qu'au cas par cas. Il sera nécessaire de remettre en question les modes de pathogénicité des mutations pour chaque gène : perte ou gain de fonction, haplosuffisance ou haploinsuffisance, effet dominant-négatif *etc*….. Il sera également indispensable d'établir des modèles de combinaisons délétères pour des mutations sur 2 ou 3 gènes à la fois. Cet exercice sera particulièrement ardu en raison des combinaisons de variants quasiment uniques de chaque malade. La pénétrance et l'expressivité variable des mutations seront des écueils supplémentaires à l'établissement de ces modèles.

Des enquêtes familiales extensives sur plusieurs générations (phénotypiques et génétiques) seront essentielles pour l'établissement de tels modèles. La

caractérisation fonctionnelle des variants sera également indispensable en raison de la faible fiabilité des logiciels de prédiction des effets des mutations particulièrement en l'absence de modèles de structure tridimensionnelle des protéines. La définition de combinaisons de gènes, plutôt que de variants, pourra simplifier la démarche. De plus elle pourra être guidée par les données biologiques connues d'interaction entre les protéines.

L'établissement d'une relation entre le génotype ou l'haplotype avec les phénotypes (variabilité, profondeur du déficit gonadotrope, effets extra-endocriniens…) pourra *in fine* être également un objectif.

Trente-sept pour cent des patients analysés par NGS présentent des variants rares sur les « gènes candidats » ce qui laisse espérer que certains de ces gènes sont réellement impliqués dans les CHH. De plus, la moitié des patients ayant au moins un évènement moléculaire sur les « gènes classiques » ont également des variants rares sur les « gènes candidats » ce qui permet d'envisager une participation de ces variants dans le phénotype CHH. L'analyse des gènes candidats dans le panel est facilitée par l'étude exhaustive préalable des gènes déjà connus. Mais la pathogénicité des variants des « gènes candidats » restera à établir par les méthodes citées auparavant (ségrégation familiale, fréquence dans la population générale, caractérisation fonctionnelle, modèle animaux, caractéristiques phénotypiques cliniques ou hormonales particulières). Ces « gènes candidats » pourraient de plus être impliqués dans les CHH par des mécanismes oligogéniques ou avoir un impact faible comme modulateur du phénotype. Etant donné l'investissement important nécessaire pour démonter la pathogénicité d'un variant, une sélection des meilleures hypothèses est indispensable.

La présence et la fréquence de ces variants dans la population générale est un des premiers paramètres à vérifier. Les données publiques d'exome telles que les données de la database EXAC (*Exome aggregation consortium*, BroadInstitute) sont d'une grande aide. Néanmoins ces bases de données compilent des séries de sujets non représentatifs d'une population générale car recrutés pour des objectifs différents (risque cardiovasculaire, tumoral, psychiatrie *etc*.) et encore moins

représentatifs d'une population saine (en particulier sur le plan de l'axe gonadotrope). Le premier niveau de filtre des variants de ces gènes candidats repose sur la création d'une base de données privée au laboratoire permettant d'agréger les variants fréquents dans la population séquencée et d'éliminer les artefacts récurrents spécifiques de notre technique. Le deuxième niveau de filtre pourrait être la comparaison de variants et/ou agrégation de variants chez les patients atteints de CHH avec une population contrôle dont le statut endocrinien et reproductif serait connu et médicalement documenté. L'établissement d'une telle cohorte témoin et son analyse est l'une des clés de la découverte de nouveaux gènes des CHH qu'ils soient responsables à eux seuls de la pathologie ou impliqués de façon plus modérées dans la survenue ou l'expression de la pathologie.

Identification de nouveaux gènes des CHH syndromiques

Les approches sans *a priori* telles que la CGH-array ou l'analyse d'exomes nous ont permis de mettre en évidence l'implication de nouveaux gènes dans les CHH syndromiques. Ces découvertes sont fondamentales pour découvrir d'autres mécanismes physiopathologiques entrainant des CHH.

L'identification de *SEMA3A* dans les SK [214] était presque attendue car la souris KO décrite l'année précédente présentait un phénotype proche du SK chez l'Homme [182]. Néanmoins la formalisation de son implication dans le SK chez l'homme a suscité des travaux renforçant la caractérisation du complexe protéique impliqué dans sa signalisation. Les gènes codants ses partenaires font désormais partie des principaux gènes candidats explorés, notamment dans notre panel NGS. Le mode de transmission dominant, identifié dans notre article princeps, suggère l'existence potentielle de mécanismes de type oligogénique. Cette hypothèse est renforcée par les publications suivantes [214,215] qui ont confirmés l'implication de *SEMA3A* dans les CHH (*Cf.* expressivité variable au sein de la famille décrite ; expressivité variable au sein d'autres familles ; identification de variants causatifs avec une fréquence proche de 1% dans la population générale).

La découverte de mutations de *PNPLA6* était, elle, en revanche complétement inattendue [206,207]. Des mutations de ce gène codant la Neuropathy Target Esterase n'avaient été décrites que dans des formes neurologiques motrices pures [208]. Depuis des mutations de *PNPLA6* ont été retrouvées également dans les syndromes de Laurence-Moon et Oliver-MacFarlane [216,217]. Ces deux syndromes présentent une dystrophie choriorétienne (comme le BNS) et un hypogonadisme hypogonadotrope dans un contexte de déficit pituitaire multiple (les axes gonadotrope, thyréotrope, et somatotrope sont dysfonctionnels). L'ataxie cérébelleuse caractéristique commune au BNS et au GHS peut également être présente, de façon constante dans le syndrome de Laurence-Moon et dans la moitié des cas dans le syndrome d'Oliver-MacFarlane. A la différence des BNS et GHS, ces patients présentent une petite taille (déficience somatotrope), un retard mental et une réduction de la taille du cerveau. La présence fréquente de micropénis chez les patients masculins indique un déficit gonadotrope dès la période embryonnaire contrairement aux cas rapportés de BNS et GHS. De plus la spécificité du syndrome d'Oliver-MacFarlane est la trichomégalie se manifestant par des grands cils longs et épais et une alopécie. Dans toutes ces pathologies *PNPLA6* est muté sur les 2 allèles et la transmission est considérée comme autosomique récessive, les porteurs hétérozygotes étant en bonne santé.

La diversité des phénotypes et le caractère partiellement chevauchant entre les syndromes pour lesquels sont observés des mutations de *PNPLA6* invitent à tester la possibilité que certains patients présentant un hypogonadisme hypogonadotrope isolé sont porteurs de mutations de ce gène. Dans une étude préliminaire effectuée au laboratoire de Génétique de Bicêtre, nous avons effectué le séquençage de PNPLA6 chez 73 patients nCHH pour lesquels aucune mutation des gènes classiques n'était identifiée. Nous n'avons mis en évidence qu'un seul variant à l'état hétérozygote identifié chez un patient présentant un nCHH sans aucun signe neurologique. Ce variant a déjà été décrit par Synofzik et al [207] comme mutation dans les paraplégies spastiques à l'état hétérozygotes composite. Il est impossible à ce stade d'affirmer un lien entre la découverte de cette mutation et le CHH isolé chez le patient. Une enquête familiale, des analyses génétiques complémentaires

vont être réalisées. Un criblage plus large de l'ensemble de la population de patients CHH suivis à Bicêtre est actuellement en cours.

Par ailleurs, les explorations endocriniennes réalisées chez les patients suivis à Bicêtre, en accord avec certaines des observations de la littérature, suggèrent que les patients atteints de BNS et GHS présentent un HH d'origine hypophysaire. L'identification de *PNPLA6* offre donc une opportunité de mieux comprendre les mécanismes gonadotropes de la signalisation GnRH. Nous poursuivons donc l'exploration de la famille L... atteinte de GHS / BNS. Une mise en culture des fibroblastes cutanés des 2 cas index a été réalisée afin d'envisager différentes analyses fonctionnelles. Il s'agit de profiter de l'expression de *PNPLA6* dans les fibroblastes pour analyser la perte de fonction de l'enzyme. L'analyse des conséquences gonadotropes sera quant à elle plus difficile. L'expression de *PNPLA6* dans les cellules gonadotropes murines a été démontrée par les travaux de Topaloglu [206]. Plusieurs hypothèses doivent être explorées pour expliquer cette résistance pituitaire à la GnRH. Tout d'abord, il serait important d'orienter l'analyse en précisant si chez les patients la résistance pituitaire est due à un mécanisme cytotoxique vis-à-vis des cellules gonadotropes ou s'il s'agit d'une résistance des cellules gonadotropes à la GnRH. La première hypothèse est envisageable du fait du caractère progressif de l'atteinte des signes neurologiques [217]. La deuxième hypothèse a été déjà en partie explorée par Topaloglu et al. Si on considère une résistance à la GnRH, plusieurs aspects peuvent être envisagés : l'adressage du récepteur GNRHR, la transduction du signal et en particulier l'activation de ERK1/2 qui a été associée à l'activation de la transcription LHB [44] et enfin formation et exocytose des vésicules de sécrétion de la GnRH. C'est ce dernier point qui a été soulevé en partie par Topaloglu et al [206].

Des mutations de trois autres gènes ont également été rapportées comme causant des Syndromes de Gordon Holmes ou de Boucher Neuhauser : *RFN216*, *OTUD4*,[218] et *STUB1* [219]. Ces gènes codent respectivement une E3 ligase, une deubiquitinylase une protéine chaperonne pouvant ayant une fonction de type E3 ligase. L'implication de l'ubiquitination des protéines dans ces syndromes reste encore

mystérieuse. Aucune mutation de ces gènes n'a été identifiée en dehors de ces 2 études.

Importance physiopathologique des caractérisations fonctionnelles des mutants dans la sélection des patients pour la compréhension du générateur de pulsatilité hypothalamique

Les travaux sur les neuropeptides et leurs récepteurs ont permis de valider l'implication des Kisspeptines (mutations pertes de fonctions de *KISS1R* bialléliques) au cours de la vie embryonnaire chez l'homme en démontrant la forte prévalence des cryptorchidies ou des micropénis chez les patients [174].

Ils ont identifié la localisation hypothalamique de l'altération de la signalisation de la Neurokinine B [172] et ses conséquences. Les mutations pertes de fonctions de *TAC3*/*TACR3* bialléliques chez l'Homme entrainent un profil neuroendocrinien particulier en gonadotrophines [173] caractérisé par une élévation du rapport FSH/LH. Ce profil neuroendocrinien suggère un ralentissement de la sécrétion pulsatile de GnRH.

Le travail sur la restauration de la fonction gonadotrope des patients mutés pour *TAC3/TACR3* par les Kisspeptines [220] a permis de contribuer à l'établissement d'un modèle d'interaction entre deux sous populations neuronales inaccessibles aux examens directs chez l'homme. Cette expérience a permis de valider la contribution gonadotrope, dans l'espèce humaine, de chacune de ces voies de signalisation et de mettre en évidence leur influence au niveau hypothalamique sur le rythme de la pulsatilité de sécrétion de la GnRH.

Cette connaissance est essentielle pour envisager une utilisation clinique des composés dérivés de la Kisspeptine ou de la Neurokinine B dans le contrôle de la signalisation gonadotrope au niveau des neurones KNDy (agonistes/antagonistes de *KISS1R* ou de *TACR3*). Différents analogues des Kisspeptines [221] et de la Neurokinine B ont été synthétisés [222].

Les neurones KNDy sont de plus en plus considérés comme les neurones intégrateurs du statut métabolique, du niveau de stéroïdes circulants et des rythmes circadiens dans le contrôle de l'axe gonadotrope. L'administration de tels composés agissant au niveau hypothalamique est donc une piste prometteuse pour les traitements des CHH. Nous avons démontré à court terme que l'administration continue de la Kisspeptine est utilisable pour permettre un déclenchement de l'ovulation [220]. Cette utilisation peut être intéressante en dehors du traitement des patients CCH pour induire l'ovulation dans le cadre des protocoles de stimulation ovarienne lors d'Assistance Médicale à la Procréation. En particulier, cela pourrait permettre de réduire le risque de sur-stimulation ovarienne et de grossesse multiples. L'effet stimulateur de la Kisspeptine peut également être envisagé dans les hypogonadismes hypogonadotropes d'origine fonctionnelle ou métabolique comme les aménorrhées hypothalamiques [223] ou le syndrome métabolique [224].

La principale difficulté de l'utilisation de la Kisspeptine en continue ou de façon chronique est le phénomène de tachyphylaxis [223]. Ce phénomène entraine un arrêt de la stimulation des neurones à GnRH induite par l'administration régulière de la Kisspeptine. De nombreuses études ont exploré les effets de la Kisspeptine ou de ses analogues selon des protocoles d'administration variés sur des modèles cellulaires [225,226], animaux (rats [227–231], souris [232], moutons [59], chèvres [233], singes [234,235] ou chez l'Homme (sujets masculins en bonne santé [176,236,237], sujets féminins en aménorrhée hypothalamique [223], sujets mutés pour *TAC3*/*TACR3* [220]).

Le récepteur KISS1R après liaison à la Kisspeptine et signalisation intracellulaire par activation de la protéine Gq peut en effet être séquestré ou internalisé au niveau des puits recouverts de clathrine par couplage aux bêta-arrestines [238,239]. Une signalisation capable de déclencher un pic de LH, dépendante de la Kisspeptine, et indépendante du couplage à la protéine Gq, par les bêta-arrestines a été également démontré avec une activation de la voie Erk1/2 [240]. Les récepteurs couplés aux beta-arrestines après internalisation peuvent être dégradés (en minorité) ou bien rapidement recyclés à la membrane. Il existe un pool important de récepteur intracellulaire permettant de maintenir une sensibilité à la Kisspeptine. Il est

constitué d'une part par ceux internalisés par la voie des beta-arrestines et également un important pool de réserve mobilisable. La compréhension des mécanismes permettant la mobilisation du pool, le rythme d'internalisation des récepteurs KISS1R et des effets des voies de signalisation associées est cruciale pour définir des protocoles d'administration de Kisspeptine ou de ses analogues (de façon pulsatile ou chronique) afin d'obtenir les effets désirés, stimulateurs de l'axe gonadotrope ou inhibiteurs.

Une utilisation clinique peut donc également être envisagée dans d'autres pathologies [241]. L'effet suppresseur de la pulsatilité de la GnRH et plus en aval des gonadotrophines peut être obtenu par stimulation en continu ou chronique après plusieurs jours d'administration de Kisspeptine. La courte demi-vie des Kisspeptines naturelles [176] est un inconvénient pouvant être contourné par le développement et l'utilisation d'analogues résistants aux protéases [228,229]. Cet effet suppresseur pourrait être utilisé comme complément thérapeutique dans les cancers hormono-dépendants comme les cancers du sein ou de la prostate [236]. Un effet inhibiteur plus modéré pourrait être utilisé dans les traitements de l'endométriose, des ovaires polykystiques ou des hyperplasies bénignes de la prostate. L'utilisation de Neurokinine B est également pressentie pour diminuer les effets des bouffées de chaleur lors de la ménopause en bloquant les effets des œstrogènes sur la thermorégulation et la vasodilatation sous cutanées [82].

CONCLUSION GENERALE

Le CHH est une maladie cliniquement et génétiquement hétérogène, souvent difficile à diagnostiquer, surtout pendant l'adolescence. La compréhension de la diversité des phénotypes a beaucoup progressé dans les 10 dernières années grâce aux découvertes des causes génétiques et à l'amélioration de leur explorations cliniques, radiologiques et hormonales. Des traitements sont disponibles pour, non seulement stimuler une virilisation ou une œstrogènisation, mais également pour restaurer le potentiel reproductif des patients. La meilleure connaissance de la physiopathologie va certainement améliorer et affiner ces traitements dans les années à venir.

Les travaux présentés ont participé à cette amélioration des connaissances, en particulier sur la signalisation gonadotrope au niveau hypothalamique, au niveau de l'interaction entre les neurones à GnRH et les neurones KNDy. De plus, les études génétiques réalisées ont précisé les prévalences et les conséquences des mutations des gènes impliqués chez les patients nCHH. Ce sont des résultats importants pour le conseil génétique. Les progrès de la compréhension des bases moléculaires des CHH ont contribué à expliquer la cause génétique dans potentiellement 50% des cas et met au jour un modèle complexe de transmission génétique (oligogénisme) qui pourrait concerner de nombreux patients.

L'identification de nouveaux gènes, *SEMA3A* et *PNPLA6*, ouvre des perspectives fondamentales de compréhension de nouveaux mécanismes du développement de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Sur le plan génétique, ils suggèrent de nouveaux gènes candidats pour augmenter la proportion de patients pour lesquels la cause génétique pourra être identifiée.

Le séquençage nouvelle génération (NGS) est un nouvel outil pour explorer ces questions. L'exploitation des données qui en seront issues sera facilitée par la connaissance apportée par le travail réalisé au cours de ce doctorat.

BIBLIOGRAPHIE

1. Seminara, S. B., Hayes, F. J. & Crowley, W. F. Gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's syndrome): pathophysiological and genetic considerations. *Endocr. Rev.* **19,** 521–39 (1998).
2. Pennington, G. W. The reproductive endocrinology of childhood and adolescence. *Clin. Obstet. Gynaecol.* **1,** 509–531 (1974).
3. Valeri, C., Schteingart, H. F. & Rey, R. A. The prepubertal testis: biomarkers and functions. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* **20,** 224–33 (2013).
4. Biro, F. M. *et al.* Onset of breast development in a longitudinal cohort. *Pediatrics* **132,** 1019–27 (2013).
5. Nielsen, C. T. *et al.* Onset of the release of spermatozoa (spermarche) in boys in relation to age, testicular growth, pubic hair, and height. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **62,** 532–5 (1986).
6. Millar, R. P. *et al.* Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr. Rev.* **25,** 235–75 (2004).
7. Fromantin, M., Gineste, J., Didier, A. & Rouvier, J. [Impuberism and hypogonadism at induction into military service. Statistical study]. *Probl. Actuels Endocrinol. Nutr.* **16,** 179–199 (1973).
8. Brioude, F. *et al.* Non-syndromic congenital hypogonadotropic hypogonadism: clinical presentation and genotype-phenotype relationships. *Eur. J. Endocrinol.* **162,** 835–51 (2010).
9. Quinton, R. *et al.* Idiopathic gonadotrophin deficiency: genetic questions addressed through phenotypic characterization. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **55,** 163–174 (2001).
10. Seminara, S. B., Hayes, F. J. & Crowley Jr, W. F. Gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's syndrome): pathophysiological and genetic considerations. *Endocr. Rev.* **19,** 521–539 (1998).
11. Bry-Gauillard, H. *et al.* Congenital hypogonadotropic hypogonadism in females: clinical spectrum, evaluation and genetics. *Ann. Endocrinol. (Paris).* **71,** 158–62 (2010).
12. De Sanctis, V. *et al.* Acquired Hypogonadotropic Hypogonadism (AHH) in Thalassaemia Major Patients: An Underdiagnosed Condition? *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **8,** e2016001 (2016).
13. Salenave, S., Trabado, S., Maione, L., Brailly-Tabard, S. & Young, J. Male acquired hypogonadotropic hypogonadism: diagnosis and treatment. *Ann. Endocrinol. (Paris).* **73,** 141–6 (2012).
14. Viswanathan, V. & Eugster, E. A. Etiology and treatment of hypogonadism in adolescents. *Pediatr. Clin. North Am.* **58,** 1181–200, x (2011).
15. Cyr, A., Cyr, L.-O. & Cyr, C. Acquired growth hormone deficiency and hypogonadotropic hypogonadism in a subject with repeated head trauma, or Tintin goes to the neurologist. *C. Can. Med. Assoc. J.* **171,** 1433–4 (2004).
16. Huffer, V., Scott, W. H., Connor, T. B. & Lovice, H. Psychological studies of

adult male patients with sexual infantilism before and after androgen therapy. *Ann. Intern. Med.* **61,** 255–68 (1964).

17. Dwyer, A. A., Quinton, R., Morin, D. & Pitteloud, N. Identifying the unmet health needs of patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism using a web-based needs assessment: implications for online interventions and peer-to-peer support. *Orphanet J. Rare Dis.* **9,** 83 (2014).
18. Aydogan, U. *et al.* Increased frequency of anxiety, depression, quality of life and sexual life in young hypogonadotropic hypogonadal males and impacts of testosterone replacement therapy on these conditions. *Endocr. J.* **59,** 1099–105 (2012).
19. Lašaitė, L., Ceponis, J., Preikša, R. T. & Zilaitienė, B. Impaired emotional state, quality of life and cognitive functions in young hypogonadal men. *Andrologia* **46,** 1107–12 (2014).
20. Bouvattier, C. *et al.* Neonatal gonadotropin therapy in male congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Nat. Rev. Endocrinol.* **8,** 172–182 (2011).
21. Warne, D. W. *et al.* A combined analysis of data to identify predictive factors for spermatogenesis in men with hypogonadotropic hypogonadism treated with recombinant human follicle-stimulating hormone and human chorionic gonadotropin. *Fertil. Steril.* **92,** 594–604 (2009).
22. Pitteloud, N. *et al.* Predictors of outcome of long-term GnRH therapy in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87,** 4128–4136 (2002).
23. Liu, P. Y. *et al.* Induction of spermatogenesis and fertility during gonadotropin treatment of gonadotropin-deficient infertile men: predictors of fertility outcome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94,** 801–8 (2009).
24. Schwanzel-Fukuda, M., Bick, D. & Pfaff, D. W. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **6,** 311–26 (1989).
25. Teixeira, L. *et al.* Defective migration of neuroendocrine GnRH cells in human arrhinencephalic conditions. *J. Clin. Invest.* **120,** 3668–72 (2010).
26. Kakar, S. S., Musgrove, L. C., Devor, D. C., Sellers, J. C. & Neill, J. D. Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189,** 289–95 (1992).
27. Pralong, F. P. *et al.* Complete hypogonadotropic hypogonadism associated with a novel inactivating mutation of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84,** 3811–6 (1999).
28. Meysing, A. U. *et al.* GNRHR mutations in a woman with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism highlight the differential sensitivity of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone to gonadotropin-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89,** 3189–98 (2004).
29. Silveira, L. F. G. *et al.* Novel homozygous splice acceptor site GnRH receptor (GnRHR) mutation: human GnRHR 'knockout'. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87,** 2973–7 (2002).
30. Kottler, M. L., Counis, R. & Bouchard, P. Mutations of the GnRH receptor gene: a new cause of autosomal-recessive hypogonadotropic hypogonadism. *Arch. Med. Res.* **30,** 481–5

31. Söderlund, D., Canto, P., de la Chesnaye, E., Ulloa-Aguirre, A. & Méndez, J. P. A novel homozygous mutation in the second transmembrane domain of the gonadotrophin releasing hormone receptor gene. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **54,** 493–8 (2001).
32. Costa, E. M. *et al.* Two novel mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor gene in Brazilian patients with hypogonadotropic hypogonadism and normal olfaction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86,** 2680–6 (2001).
33. Layman, L. C. *et al.* Mutations in gonadotropin-releasing hormone receptor gene cause hypogonadotropic hypogonadism. *Nat. Genet.* **18,** 14–5 (1998).
34. de Roux, N. *et al.* A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *N. Engl. J. Med.* **337,** 1597–602 (1997).
35. Tello, J. A. *et al.* Congenital hypogonadotropic hypogonadism due to GnRH receptor mutations in three brothers reveal sites affecting conformation and coupling. *PLoS One* **7,** e38456 (2012).
36. Beranova, M. *et al.* Prevalence, phenotypic spectrum, and modes of inheritance of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86,** 1580–8 (2001).
37. Conn, P. M. & Janovick, J. A. Trafficking and quality control of the gonadotropin releasing hormone receptor in health and disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* **299,** 137–145 (2009).
38. de Roux, N. *et al.* The same molecular defects of the gonadotropin-releasing hormone receptor determine a variable degree of hypogonadism in affected kindred. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84,** 567–72 (1999).
39. Pitteloud, N. *et al.* The fertile eunuch variant of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: spontaneous reversal associated with a homozygous mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86,** 2470–5 (2001).
40. Seminara, S. B. *et al.* Successful use of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) for ovulation induction and pregnancy in a patient with GnRH receptor mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85,** 556–62 (2000).
41. Lin, L. *et al.* A homozygous R262Q mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor presenting as constitutional delay of growth and puberty with subsequent borderline oligospermia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91,** 5117–21 (2006).
42. Bouligand, J. *et al.* Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. *N. Engl. J. Med.* **360,** 2742–8 (2009).
43. Chan, Y.-M. *et al.* GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106,** 11703–8 (2009).
44. Maione, L. *et al.* R31C GNRH1 mutation and congenital hypogonadotropic hypogonadism. *PLoS One* **8,** e69616 (2013).
45. Navarro, V. M. *et al.* Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* **146,** 156–63 (2005).

46. Han, S.-K. *et al.* Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J. Neurosci.* **25,** 11349–56 (2005).
47. Lee, J. H. *et al.* KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J. Natl. Cancer Inst.* **88,** 1731–1737 (1996).
48. Lee, D. K. *et al.* Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett.* **446,** 103–7 (1999).
49. Castaño, J. P. *et al.* Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity? *Peptides* **30,** 10–5 (2009).
50. Muir, A. I. *et al.* AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J. Biol. Chem.* **276,** 28969–75 (2001).
51. Ohtaki, T. *et al.* Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* **411,** 613–7 (2001).
52. Kotani, M. *et al.* The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J. Biol. Chem.* **276,** 34631–6 (2001).
53. de Roux, N. *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100,** 10972–6 (2003).
54. Seminara, S. B. *et al.* The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. *N. Engl. J. Med.* **349,** 1614–1627 (2003).
55. Semple, R. K. *et al.* Two Novel Missense Mutations in G Protein-Coupled Receptor 54 in a Patient with Hypogonadotropic Hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90,** 1849–1855 (2005).
56. Smith, J. T. & Clarke, I. J. Kisspeptin expression in the brain: catalyst for the initiation of puberty. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **8,** 1–9 (2007).
57. Gottsch, M. L. *et al.* A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* **145,** 4073–7 (2004).
58. Shahab, M. *et al.* Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 2129–34 (2005).
59. Messager, S. *et al.* Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 1761–6 (2005).
60. Thompson, E. L. *et al.* Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J. Neuroendocrinol.* **16,** 850–8 (2004).
61. Dhillo, W. S. *et al.* Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90,** 6609–15 (2005).
62. Matsui, H., Takatsu, Y., Kumano, S., Matsumoto, H. & Ohtaki, T. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320,** 383–8 (2004).
63. Irwig, M. S. *et al.* Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* **80,** 264–72 (2004).
64. Navarro, V. M. *et al.* Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on

follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* **146,** 1689–97 (2005).

65. Topaloglu, A. K. *et al.* Inactivating KISS1 Mutation and Hypogonadotropic Hypogonadism. *N. Engl. J. Med.* **366,** 629–635 (2012).
66. Colledge, W. H. Transgenic mouse models to study Gpr54/kisspeptin physiology. *Peptides* **30,** 34–41 (2009).
67. d'Anglemont de Tassigny, X. *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 10714–9 (2007).
68. Funes, S. *et al.* The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312,** 1357–63 (2003).
69. Lanfranco, F. *et al.* Role of sequence variations of the GnRH receptor and G protein-coupled receptor 54 gene in male idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Eur. J. Endocrinol.* **153,** 845–52 (2005).
70. Lapatto, R. *et al.* Kiss1-/- mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54-/- mice. *Endocrinology* **148,** 4927–36 (2007).
71. Tenenbaum-Rakover, Y. *et al.* Neuroendocrine phenotype analysis in five patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism due to a L102P inactivating mutation of GPR54. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92,** 1137–44 (2007).
72. Goodman, R. L. *et al.* Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* **148,** 5752–60 (2007).
73. Topaloglu, A. K. *et al.* 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 (2009).
74. Guran, T. *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism due to a novel missense mutation in the first extracellular loop of the neurokinin B receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94,** 3633–3639 (2009).
75. Gianetti, E. *et al.* TAC3/TACR3 mutations reveal preferential activation of gonadotropin-releasing hormone release by neurokinin B in neonatal life followed by reversal in adulthood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95,** 2857–67 (2010).
76. Krajewski, S. J. *et al.* Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. *J. Comp. Neurol.* **489,** 372–86 (2005).
77. Navarro, V. M. *et al.* Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J. Neurosci.* **29,** 11859–11866 (2009).
78. Wakabayashi, Y. *et al.* Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J. Neurosci.* **30,** 3124–3132 (2010).
79. Mittelman-Smith, M. a. *et al.* Arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons mediate the estrogen suppression of gonadotropin secretion and body weight. *Endocrinology* **153,** 2800–2812 (2012).

80. Goodman, R. L., Gibson, M., Skinner, D. C. & Lehman, M. N. Neuroendocrine control of pulsatile GnRH secretion during the ovarian cycle: evidence from the ewe. *Reprod. Suppl.* **59,** 41–56 (2002).
81. Rometo, A. M., Krajewski, S. J., Voytko, M. Lou & Rance, N. E. Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92,** 2744–50 (2007).
82. Mittelman-Smith, M. A., Williams, H., Krajewski-Hall, S. J., McMullen, N. T. & Rance, N. E. Role for kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons in cutaneous vasodilatation and the estrogen modulation of body temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109,** 19846–51 (2012).
83. Okamura, H. *et al.* Male effect pheromone tickles the gonadotrophin-releasing hormone pulse generator. *J. Neuroendocrinol.* **22,** 825–832 (2010).
84. Forni, P. E. & Wray, S. GnRH, anosmia and hypogonadotropic hypogonadism--where are we? *Front. Neuroendocrinol.* **36,** 165–77 (2015).
85. Lehman, M. N., Coolen, L. M. & Goodman, R. L. Minireview: Kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: A central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* **151,** 3479–3489 (2010).
86. Ramaswamy, S. *et al.* Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (Macaca mulatta) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus. *Endocrinology* **151,** 4494–4503 (2010).
87. Rance, N. E., Krajewski, S. J., Smith, M. a., Cholanian, M. & Dacks, P. a. Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. *Brain Res.* **1364,** 116–128 (2010).
88. Billings, H. J. *et al.* Neurokinin B acts via the neurokinin-3 receptor in the retrochiasmatic area to stimulate luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* **151,** 3836–3846 (2010).
89. Lippincott, M. F., True, C. & Seminara, S. B. Use of genetic models of idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism in mice and men to understand the mechanisms of disease. *Exp. Physiol.* **98,** 1522–7 (2013).
90. Semaan, S. J., Tolson, K. P. & Kauffman, A. S. The development of kisspeptin circuits in the Mammalian brain. *Adv. Exp. Med. Biol.* **784,** 221–52 (2013).
91. Pawlowitzki, I. H., Diekstall, P., Schadel, A. & Miny, P. Estimating frequency of Kallmann syndrome among hypogonadic and among anosmic patients. *Am. J. Med. Genet.* **26,** 473–9 (1987).
92. De Morsier, G. & Gauthier, G. [Olfacto-genital dysplasia]. *Pathol. Biol. (Paris).* **11,** 1267–72 (1963).
93. Waldstreicher, J. *et al.* The genetic and clinical heterogeneity of gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81,** 4388–95 (1996).
94. Georgopoulos, N. A. *et al.* Genetic heterogeneity evidenced by low incidence of KAL-1 gene mutations in sporadic cases of gonadotropin-releasing hormone deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82,** 213–7 (1997).
95. Wray, S., Grant, P. & Gainer, H. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86,**

8132–6 (1989).
96. Ballabio, A. *et al.* Contiguous gene syndromes due to deletions in the distal short arm of the human X chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86,** 10001–5 (1989).
97. Franco, B. *et al.* A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature* **353,** 529–36 (1991).
98. Legouis, R. *et al.* The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* **67,** 423–35 (1991).
99. Bülow, H. E., Berry, K. L., Topper, L. H., Peles, E. & Hobert, O. 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,** 6346–51 (2002).
100. Soussi-Yanicostas, N. *et al.* Anosmin-1, defective in the X-linked form of Kallmann syndrome, promotes axonal branch formation from olfactory bulb output neurons. *Cell* **109,** 217–28 (2002).
101. Rugarli, E. I. *et al.* The Kallmann syndrome gene homolog in C. elegans is involved in epidermal morphogenesis and neurite branching. *Development* **129,** 1283–94 (2002).
102. Cariboni, A. *et al.* The product of X-linked Kallmann's syndrome gene (KAL1) affects the migratory activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. *Hum. Mol. Genet.* **13,** 2781–91 (2004).
103. Lutz, B. *et al.* Expression of the Kallmann syndrome gene in human fetal brain and in the manipulated chick embryo. *Hum. Mol. Genet.* **3,** 1717–23 (1994).
104. Duke, V. M. *et al.* KAL, a gene mutated in Kallmann's syndrome, is expressed in the first trimester of human development. *Mol. Cell. Endocrinol.* **110,** 73–9 (1995).
105. Tsai, P.-S. & Gill, J. C. Mechanisms of disease: Insights into X-linked and autosomal-dominant Kallmann syndrome. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **2,** 160–71 (2006).
106. Trarbach, E. B., Silveira, L. G. & Latronico, A. C. Genetic insights into human isolated gonadotropin deficiency. *Pituitary* **10,** 381–91 (2007).
107. Salenave, S. *et al.* Kallmann's syndrome: a comparison of the reproductive phenotypes in men carrying KAL1 and FGFR1/KAL2 mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93,** 758–63 (2008).
108. Pitteloud, N. *et al.* 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,** 1317–22 (2005).
109. Zenteno, J. C., Méndez, J. P., Maya-Núñez, G., Ulloa-Aguirre, A. & Kofman-Alfaro, S. Renal abnormalities in patients with Kallmann syndrome. *BJU Int.* **83,** 383–6 (1999).
110. Schwankhaus, J. D., Currie, J., Jaffe, M. J., Rose, S. R. & Sherins, R. J. Neurologic findings in men with isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Neurology* **39,** 223–6 (1989).
111. Quinton, R. *et al.* Idiopathic gonadotrophin deficiency: genetic questions addressed through phenotypic characterization. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **55,** 163–74 (2001).

112. Dodé, C. *et al.* Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat. Genet.* **33,** 463–5 (2003).
113. Vermeulen, S. *et al.* Kallmann syndrome in a patient with congenital spherocytosis and an interstitial 8p11.2 deletion. *Am. J. Med. Genet.* **108,** 315–8 (2002).
114. Raivio, T. *et al.* Reversal of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *N. Engl. J. Med.* **357,** 863–73 (2007).
115. Pirvola, U. *et al.* FGFR1 is required for the development of the auditory sensory epithelium. *Neuron* **35,** 671–80 (2002).
116. Rice, D. P. C., Rice, R. & Thesleff, I. Molecular mechanisms in calvarial bone and suture development, and their relation to craniosynostosis. *Eur. J. Orthod.* **25,** 139–48 (2003).
117. Ibrahimi, O. A., Zhang, F., Hrstka, S. C. L., Mohammadi, M. & Linhardt, R. J. Kinetic model for FGF, FGFR, and proteoglycan signal transduction complex assembly. *Biochemistry* **43,** 4724–30 (2004).
118. McKeehan, W. L. & Kan, M. Heparan sulfate fibroblast growth factor receptor complex: structure-function relationships. *Mol. Reprod. Dev.* **39,** 69–81; discusison 81–2 (1994).
119. Hu, Y. & Bouloux, P.-M. Novel insights in FGFR1 regulation: lessons from Kallmann syndrome. *Trends Endocrinol. Metab.* **21,** 385–93 (2010).
120. Falardeau, J. *et al.* Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J. Clin. Invest.* **118,** 2822–31 (2008).
121. Inatani, M., Irie, F., Plump, A. S., Tessier-Lavigne, M. & Yamaguchi, Y. Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate. *Science* **302,** 1044–6 (2003).
122. Hu, Y., González-Martínez, D., Kim, S.-H. & Bouloux, P. M. G. Cross-talk of anosmin-1, the protein implicated in X-linked Kallmann's syndrome, with heparan sulphate and urokinase-type plasminogen activator. *Biochem. J.* **384,** 495–505 (2004).
123. Hudson, M. L., Kinnunen, T., Cinar, H. N. & Chisholm, A. D. C. elegans Kallmann syndrome protein KAL-1 interacts with syndecan and glypican to regulate neuronal cell migrations. *Dev. Biol.* **294,** 352–65 (2006).
124. Bülow, H. E. & Hobert, O. Differential sulfations and epimerization define heparan sulfate specificity in nervous system development. *Neuron* **41,** 723–36 (2004).
125. Tornberg, J. *et al.* 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,** 11524–9 (2011).
126. Masumoto, K. *et al.* Distinct localization of prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 mRNAs in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* **23,** 2959–70 (2006).
127. Pitteloud, N. *et al.* 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,** 17447–52 (2007).
128. Dodé, C. *et al.* Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding

prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet.* **2,** e175 (2006).
129. Abreu, A. P. *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.* **93,** 4113–8 (2008).
130. Cole, L. W. *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.* **93,** 3551–9 (2008).
131. Sykiotis, G. P. *et al.* Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107,** 15140–4 (2010).
132. Leroy, C. *et al.* Biallelic mutations in the prokineticin-2 gene in two sporadic cases of Kallmann syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **16,** 865–8 (2008).
133. Narita, T. *et al.* Human transcription elongation factor NELF: identification of novel subunits and reconstitution of the functionally active complex. *Mol. Cell. Biol.* **23,** 1863–73 (2003).
134. Miura, K., Acierno, J. S. & Seminara, S. B. Characterization of the human nasal embryonic LHRH factor gene, NELF, and a mutation screening among 65 patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (IHH). *J. Hum. Genet.* **49,** 265–268 (2004).
135. Pitteloud, N. *et al.* Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Invest.* **117,** 457–63 (2007).
136. Driscoll, D. J. *et al.* A DNA methylation imprint, determined by the sex of the parent, distinguishes the Angelman and Prader-Willi syndromes. *Genomics* **13,** 917–24 (1992).
137. Butler, M. G., Meaney, F. J. & Palmer, C. G. Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Prader-Labhart-Willi syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **23,** 793–809 (1986).
138. Magenis, R. E. *et al.* Comparison of the 15q deletions in Prader-Willi and Angelman syndromes: specific regions, extent of deletions, parental origin, and clinical consequences. *Am. J. Med. Genet.* **35,** 333–49 (1990).
139. Alton, D. J. & McDonald, P. Urographic findings in the Bardet-Biedl syndrome, formerly the Laurence-Moon-Biedl syndrome. *Radiology* **109,** 659–63 (1973).
140. Beales, P. L., Elcioglu, N., Woolf, A. S., Parker, D. & Flinter, F. A. New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J. Med. Genet.* **36,** 437–46 (1999).
141. Scheidecker, S. *et al.* Exome sequencing of Bardet-Biedl syndrome patient identifies a null mutation in the BBSome subunit BBIP1 (BBS18). *J. Med. Genet.* **51,** 132–6 (2014).
142. Vissers, L. E. L. M. *et al.* Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat. Genet.* **36,** 955–7 (2004).
143. Jongmans, M. C. J. *et al.* CHD7 mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome--the clinical overlap with CHARGE syndrome. *Clin. Genet.* **75,** 65–71 (2009).
144. Kim, H.-G. *et al.* Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **83,** 511–9 (2008).
145. Kuhlbrodt, K. *et al.* Functional analysis of Sox10 mutations found in human

Waardenburg-Hirschsprung patients. *J. Biol. Chem.* **273,** 23033–8 (1998).
146. Kim, H.-G. *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.* **87,** 465–79 (2010).
147. Licinio, J. *et al.* Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101,** 4531–4536 (2004).
148. Schwartz, M., Blichfeldt, S. & Müller, J. X-linked adrenal hypoplasia in a large Greenlandic family. Detection of a missense mutation (N4401) in the DAX-1 gene; implication for genetic counselling and carrier diagnosis. *Hum. Genet.* **99,** 83–7 (1997).
149. Miraoui, H. *et al.* Mutations in FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, and FLRT3 are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Am. J. Hum. Genet.* **92,** 725–43 (2013).
150. Dattani, M. T. *et al.* Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat. Genet.* **19,** 125–33 (1998).
151. Clément, K. *et al.* A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* **392,** 398–401 (1998).
152. Jackson, R. S. *et al.* Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat. Genet.* **16,** 303–6 (1997).
153. Au, M. G., Crowley, W. F. & Buck, C. L. Genetic counseling for isolated GnRH deficiency. *Mol. Cell. Endocrinol.* **346,** 102–9 (2011).
154. Marcos, S. *et al.* The prevalence of CHD7 missense versus truncating mutations is higher in patients with Kallmann syndrome than in typical CHARGE patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99,** E2138–43 (2014).
155. Dodé, C. & Hardelin, J.-P. Clinical genetics of Kallmann syndrome. *Ann. Endocrinol. (Paris).* **71,** 149–157 (2010).
156. Lu, J. T., Campeau, P. M. & Lee, B. H. Genotype-phenotype correlation--promiscuity in the era of next-generation sequencing. *N. Engl. J. Med.* **371,** 593–6 (2014).
157. Nimri, R. *et al.* A novel loss-of-function mutation in GPR54/KISS1R leads to hypogonadotropic hypogonadism in a highly consanguineous family. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96,** E536–45 (2011).
158. Teles, M. G. *et al.* A novel homozygous splice acceptor site mutation of KISS1R in two siblings with normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Eur. J. Endocrinol.* **163,** 29–34 (2010).
159. Demirbilek, H. *et al.* Normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism due to a novel homozygous nonsense c.C969A (p.Y323X) mutation in the KISS1R gene in three unrelated families. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **82,** 429–38 (2015).
160. Breuer, O. *et al.* A novel severe N-terminal splice site KISS1R gene mutation causes hypogonadotropic hypogonadism but enables a normal development of neonatal external genitalia. *Eur. J. Endocrinol.* **167,** 209–16 (2012).
161. Miraoui, H. *et al.* Mutations in FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, and FLRT3 are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism.

Am. J. Hum. Genet. **92,** 725–743 (2013).
162. Brioude, F. *et al.* Two Families with Normosmic Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism and Biallelic Mutations in KISS1R (KISS1 Receptor): Clinical Evaluation and Molecular Characterization of a Novel Mutation. *PLoS One* **8,** e53896 (2013).
163. Pallais, J. C., Bo-Abbas, Y., Pitteloud, N., Crowley, W. F. & Seminara, S. B. Neuroendocrine, gonadal, placental, and obstetric phenotypes in patients with IHH and mutations in the G-protein coupled receptor, GPR54. *Mol. Cell. Endocrinol.* **254-255,** 70–7 (2006).
164. Chevrier, L. *et al.* PRR Repeats in the Intracellular Domain of KISS1R Are Important for Its Export to Cell Membrane. *Mol. Endocrinol.* **27,** 1004–1014 (2013).
165. Cerrato, F. *et al.* Coding sequence analysis of GNRHR and GPR54 in patients with congenital and adult-onset forms of hypogonadotropic hypogonadism. *Eur. J. Endocrinol.* **155 Suppl ,** S3–S10 (2006).
166. Laitinen, E.-M. *et al.* Reversible congenital hypogonadotropic hypogonadism in patients with CHD7, FGFR1 or GNRHR mutations. *PLoS One* **7,** e39450 (2012).
167. Quinton, R. *et al.* Kallmann's syndrome: is it always for life? *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **50,** 481–5 (1999).
168. Sinisi, A. A. *et al.* Homozygous mutation in the prokineticin-receptor2 gene (Val274Asp) presenting as reversible Kallmann syndrome and persistent oligozoospermia: case report. *Hum. Reprod.* **23,** 2380–4 (2008).
169. Sidhoum, V. F. *et al.* Reversal and relapse of hypogonadotropic hypogonadism: resilience and fragility of the reproductive neuroendocrine system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99,** 861–70 (2014).
170. Siuciak, J. A. *et al.* Disruption of the neurokinin-3 receptor (NK3) in mice leads to cognitive deficits. *Psychopharmacology (Berl).* **194,** 185–95 (2007).
171. Hasenöhrl, R. U. *et al.* Substance P and its role in neural mechanisms governing learning, anxiety and functional recovery. *Neuropeptides* **34,** 272–80 (2000).
172. Young, J. *et al.* TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95,** 2287–2295 (2010).
173. Francou, B. *et al.* Normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism due to TAC3/TACR3 mutations: characterization of neuroendocrine phenotypes and novel mutations. *PLoS One* **6,** e25614 (2011).
174. Francou, B. *et al.* Prevalence of KISS1R mutations in a series of 603 patients with normosmic congenital hypogonadotrophic hypogonadism and characterization of novel mutations. A Single-Center Study.No Title. *Hum. Reprod.*
175. Li, X.-F. *et al.* Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat. *PLoS One* **4,** e8334 (2009).
176. George, J. T. *et al.* Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96,** E1228–36 (2011).
177. Bick, D. *et al.* Intragenic Deletion of the KALIG-1 Gene in Kallmann's

Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **326,** 1752–1755 (1992).
178. Hardelin, J. P. *et al.* Heterogeneity in the mutations responsible for X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **2,** 373–7 (1993).
179. Kozlov, G. *et al.* Insights into function of PSI domains from structure of the Met receptor PSI domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321,** 234–40 (2004).
180. Gherardi, E., Love, C. A., Esnouf, R. M. & Jones, E. Y. The sema domain. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14,** 669–78 (2004).
181. Janssen, B. J. C. *et al.* Neuropilins lock secreted semaphorins onto plexins in a ternary signaling complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19,** 1293–9 (2012).
182. Cariboni, A. *et al.* Defective gonadotropin-releasing hormone neuron migration in mice lacking SEMA3A signalling through NRP1 and NRP2: implications for the aetiology of hypogonadotropic hypogonadism. *Hum. Mol. Genet.* **20,** 336–44 (2011).
183. Hanchate, N. K. *et al.* SEMA3A, a gene involved in axonal pathfinding, is mutated in patients with Kallmann syndrome. *PLoS Genet.* **8,** e1002896 (2012).
184. Holmes, G. A form of familial degeneration of the cerebellum. *Brain* **30,** 466–489 (1907).
185. Fok, A. C., Wong, M. C. & Cheah, J. S. Syndrome of cerebellar ataxia and hypogonadotrophic hypogonadism: evidence for pituitary gonadotrophin deficiency. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **52,** 407–9 (1989).
186. Seminara, S. B., Acierno, J. S., Abdulwahid, N. A., Crowley, W. F. & Margolin, D. H. Hypogonadotropic hypogonadism and cerebellar ataxia: detailed phenotypic characterization of a large, extended kindred. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87,** 1607–12 (2002).
187. Salvador, F., García-Arumí, J., Corcóstegui, B., Minoves, T. & Tarrus, F. Ophthalmologic findings in a patient with cerebellar ataxia, hypogonadotropic hypogonadism, and chorioretinal dystrophy. *Am. J. Ophthalmol.* **120,** 241–4 (1995).
188. Vielhaber, S., Ebert, A. D., Feistner, H. & Herrmann, M. Frontal-executive dysfunction in early onset cerebellar ataxia of Holmes' type. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **102,** 102–5 (2000).
189. Erdem, E., Erbasp6 & Varli, K. Nosology of the syndrome of spinocerebellar ataxia, hypogonadotropic hypogonadism, and choroidal dystrophy. *Am. J. Med. Genet.* **53,** 393–4 (1994).
190. Baroncini, A., Franco, N. & Forabosco, A. A new family with chorioretinal dystrophy, spinocerebellar ataxia and hypogonadotropic hypogonadism (Boucher-Neuhäuser syndrome). *Clin Genet* **39,** 274–7 (1991).
191. Santos, A. V, Saraiva, P. F. & Breia, P. N. [Significance of neuroimaging in the diagnosis of Boucher-Neuhauser syndrome]. *Acta médica Port.* **16,** 193–5
192. Erdemoğlu, A. K., Akbostanci, M. C. & Selçuki, D. Familial cerebellar ataxia and hypogonadism associated with sensorimotor axonal polyneuropathy. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **102,** 129–34 (2000).
193. Rizzi, R. *et al.* Cerebellar ataxia, hypogonadism and chorioretinopathy: molecular analysis of an Italian family. *Ital. J. Neurol. Sci.* **19,** 41–4 (1998).
194. Rump, P., Hamel, B. C., Pinckers, A. J. & van Dop, P. A. Two sibs with

chorioretinal dystrophy, hypogonadotrophic hypogonadism, and cerebellar ataxia: Boucher-Neuhäuser syndrome. *J. Med. Genet.* **34,** 767–71 (1997).

195. Quinton, R., Barnett, P., Coskeran, P. & Bouloux, P. M. Gordon Holmes spinocerebellar ataxia: a gonadotrophin deficiency syndrome resistant to treatment with pulsatile gonadotrophin-releasing hormone. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **51,** 525–9 (1999).
196. De Michele, G. *et al.* Cerebellar ataxia and hypogonadism. A clinicopathological report. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **92,** 67–70 (1990).
197. Abs, R. *et al.* Congenital cerebellar hypoplasia and hypogonadotropic hypogonadism. *J. Neurol. Sci.* **98,** 259–65 (1990).
198. Jbour, A.-K. *et al.* Hypogonadotrophic hypogonadism, short stature, cerebellar ataxia, rod-cone retinal dystrophy, and hypersegmented neutrophils: a novel disorder or a new variant of Boucher-Neuhauser syndrome? *J. Med. Genet.* **40,** e2 (2003).
199. Tojo, K. *et al.* A new family of Boucher-Neuhäuser syndrome: coexistence of Holmes type cerebellar atrophy, hypogonadotropic hypogonadism and retinochoroidal degeneration: case reports and review of literature. *Endocr. J.* **42,** 367–76 (1995).
200. Boucher, B. J. & Gibberd, F. B. Familial ataxia, hypogonadism and retinal degeneration. *Acta Neurol. Scand.* **45,** 507–10 (1969).
201. Neuhäuser, G. & Opitz, J. M. Autosomal recessive syndrome of cerebellar ataxia and hypogonadotropic hypogonadism. *Clin. Genet.* **7,** 426–34
202. Stoetzel, C. *et al.* Identification of a novel BBS gene (BBS12) highlights the major role of a vertebrate-specific branch of chaperonin-related proteins in Bardet-Biedl syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **80,** 1–11 (2007).
203. Rüschendorf, F. & Nürnberg, P. ALOHOMORA: a tool for linkage analysis using 10K SNP array data. *Bioinformatics* **21,** 2123–5 (2005).
204. Abecasis, G. R., Cherny, S. S., Cookson, W. O. & Cardon, L. R. Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat. Genet.* **30,** 97–101 (2002).
205. Cingolani, P. *et al.* A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of Drosophila melanogaster strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin).* **6,** 80–92
206. Topaloglu, A. K. *et al.* Loss-of-Function Mutations in PNPLA6 Encoding Neuropathy Target Esterase Underlie Pubertal Failure and Neurological Deficits in Gordon Holmes Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99,** E2067–E2075 (2014).
207. Synofzik, M. *et al.* PNPLA6 mutations cause Boucher-Neuhäuser and Gordon Holmes syndromes as part of a broad neurodegenerative spectrum. *Brain* **137,** 69–77 (2014).
208. Rainier, S. *et al.* Neuropathy target esterase gene mutations cause motor neuron disease. *Am. J. Hum. Genet.* **82,** 780–5 (2008).
209. Johnson, M. K. The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. Identification of the phosphorylation site as an esterase. *Biochem. J.* **114,** 711–7 (1969).
210. Johnson, M. K. A phosphorylation site in brain and the delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. *Biochem. J.* **111,** 487–95

(1969).
211. Moser, M. *et al.* Cloning and expression of the murine sws/NTE gene. *Mech. Dev.* **90,** 279–82 (2000).
212. Castéra, L. *et al.* Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. *Eur. J. Hum. Genet.* **22,** 1305–13 (2014).
213. Francou, B. *et al.* Forte prévalence de l'oligogénisme dans les hypogonadismes hypogonadotropes congénitaux (HHC)/Kallmann (KS) par séquençage nouvelle génération (NGS). in *Annales d'Endocrinologie* 76(4)327 (2015).
214. Young, J. *et al.* SEMA3A deletion in a family with Kallmann syndrome validates the role of semaphorin 3A in human puberty and olfactory system development. *Hum. Reprod.* **27,** 1460–1465 (2012).
215. Känsäkoski, J. *et al.* Mutation screening of SEMA3A and SEMA7A in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Pediatr. Res.* **75,** 641–4 (2014).
216. Chalvon-Demersay, A. *et al.* [Laurence-Moon (Bardet-Biedl) syndrome with growth hormone deficiency]. *Arch. Fr. pédiatrie* **50,** 859–62 (1993).
217. Hufnagel, R. B. *et al.* Neuropathy target esterase impairments cause Oliver-McFarlane and Laurence-Moon syndromes. *J. Med. Genet.* **52,** 85–94 (2015).
218. Margolin, D. H. *et al.* Ataxia, dementia, and hypogonadotropism caused by disordered ubiquitination. *N. Engl. J. Med.* **368,** 1992–2003 (2013).
219. Shi, C. H. *et al.* Ataxia and hypogonadism caused by the loss of ubiquitin ligase activity of the U box protein CHIP. *Hum. Mol. Genet.* **23,** 1013–1024 (2014).
220. Young, J. *et al.* Kisspeptin Restores Pulsatile LH Secretion in Patients with Neurokinin B Signaling Deficiencies: Physiological, Pathophysiological and Therapeutic Implications. *Neuroendocrinology* **97,** 193–202 (2013).
221. Roseweir, A. K. & Millar, R. P. Kisspeptin antagonists. *Adv. Exp. Med. Biol.* **784,** 159–86 (2013).
222. Millar, R. P. & Newton, C. L. Current and future applications of GnRH, kisspeptin and neurokinin B analogues. *Nat. Rev. Endocrinol.* **9,** 451–66 (2013).
223. Jayasena, C. N. *et al.* Subcutaneous injection of kisspeptin-54 acutely stimulates gonadotropin secretion in women with hypothalamic amenorrhea, but chronic administration causes tachyphylaxis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94,** 4315–23 (2009).
224. George, J. T., Millar, R. P. & Anderson, R. A. Hypothesis: kisspeptin mediates male hypogonadism in obesity and type 2 diabetes. *Neuroendocrinology* **91,** 302–7 (2010).
225. Bianco, S. D. C. *et al.* KISS1R intracellular trafficking and degradation: effect of the Arg386Pro disease-associated mutation. *Endocrinology* **152,** 1616–26 (2011).
226. Babwah, A. V, Pampillo, M., Min, L., Kaiser, U. B. & Bhattacharya, M. Single-cell analyses reveal that KISS1R-expressing cells undergo sustained kisspeptin-induced signaling that is dependent upon an influx of extracellular Ca2+. *Endocrinology* **153,** 5875–87 (2012).

227. Thompson, E. L. *et al.* Chronic subcutaneous administration of kisspeptin-54 causes testicular degeneration in adult male rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **291,** E1074–82 (2006).
228. Matsui, H. *et al.* Chronic administration of the metastin/kisspeptin analog KISS1-305 or the investigational agent TAK-448 suppresses hypothalamic pituitary gonadal function and depletes plasma testosterone in adult male rats. *Endocrinology* **153,** 5297–308 (2012).
229. Matsui, H. *et al.* Pharmacologic profiles of investigational kisspeptin/metastin analogues, TAK-448 and TAK-683, in adult male rats in comparison to the GnRH analogue leuprolide. *Eur. J. Pharmacol.* **735,** 77–85 (2014).
230. Tovar, S. *et al.* Effects of single or repeated intravenous administration of kisspeptin upon dynamic LH secretion in conscious male rats. *Endocrinology* **147,** 2696–704 (2006).
231. Roa, J. *et al.* Desensitization of gonadotropin responses to kisspeptin in the female rat: analyses of LH and FSH secretion at different developmental and metabolic states. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **294,** E1088–96 (2008).
232. d'Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L. A., Carlton, M. B. L. & Colledge, W. H. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* **149,** 3926–32 (2008).
233. Yamamura, T. *et al.* The effects of chronic subcutaneous administration of an investigational kisspeptin analog, TAK-683, on gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in goats. *Neuroendocrinology* **100,** 250–64 (2014).
234. Seminara, S. B., Dipietro, M. J., Ramaswamy, S., Crowley, W. F. & Plant, T. M. Continuous human metastin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (Macaca mulatta): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology* **147,** 2122–6 (2006).
235. Ramaswamy, S. *et al.* Effect of continuous intravenous administration of human metastin 45-54 on the neuroendocrine activity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in the adult male rhesus monkey (Macaca mulatta). *Endocrinology* **148,** 3364–70 (2007).
236. MacLean, D. B., Matsui, H., Suri, A., Neuwirth, R. & Colombel, M. Sustained exposure to the investigational Kisspeptin analog, TAK-448, down-regulates testosterone into the castration range in healthy males and in patients with prostate cancer: results from two phase 1 studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99,** E1445–53 (2014).
237. Scott, G. *et al.* Double-blind, randomized, placebo-controlled study of safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of TAK-683, an investigational metastin analogue in healthy men. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **75,** 381–91 (2013).
238. Pampillo, M. *et al.* Regulation of GPR54 signaling by GRK2 and {beta}-arrestin. *Mol. Endocrinol.* **23,** 2060–74 (2009).
239. Szereszewski, J. M. *et al.* GPR54 regulates ERK1/2 activity and hypothalamic gene expression in a Gα(q/11) and β-arrestin-dependent manner. *PLoS One* **5,** e12964 (2010).
240. Ahow, M. *et al.* KISS1R signals independently of Gαq/11 and triggers LH

secretion via the β-arrestin pathway in the male mouse. *Endocrinology* **155,** 4433–46 (2014).

241. Millar, R. P. & Babwah, A. V. KISS1R: Hallmarks of an Effective Regulator of the Neuroendocrine Axis. *Neuroendocrinology* **101,** 193–210 (2015).

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS REALISEES

Articles originaux

1. Francou B, Paul C, Amazit L, Cartes A, Bouvattier C, Albarel F, Maiter D, Chanson P, Trabado T, Brailly-Tabard S, Brue T, Guiochon-Mantel A, Young J, and Bouligand J. *Prevalence of KISS1R mutations in a series of 603 patients with normosmic congenital hypogonadotrophic hypogonadism and characterization of novel mutations. A Single-Center Study*. **Hum Reprod 2016 (sous presse)**
2. Bouali N, Francou B, Bouligand J, Lakhal B, Malek I, Kammoun M, Warszawski J, Mougou S, Saad A, Guiochon-Mantel A. *NOBOX is a strong autosomal candidate gene in Tunisian patients with primary ovarian insufficiency*. **Clin Genet. 2016** Feb 5.
3. Bouali N, Hmida D, Mougou S, Bouligand J, Lakhal B, Dimessi S, Francou B, Saad G, Trabelsi S, Zaouali M, Gribaa M, Chaieb M, Bibi M, Guiochon-Mantel A, Saad A. *Analysis of FMR1 gene premutation and X chromosome cytogenetic abnormalities in 100 Tunisian patients presenting premature ovarian failure*. **Ann Endocrinol** (Paris). 2015 Dec;76(6):671-8.
4. Raymond L, Francou B, Petit F, Tosca L, Briand-Suleau A, Metay C, Martinovic J, Cordier AG, Benachi A, Pineau D, Guiochon-Mantel A, Goossens M, Tachdjian G, Brisset S. *Complex translocation t(1;12;14)(q42;q14;q32) and HMGA2 deletion in a fetus presenting growth delay and bilateral cataracts.* **Eur J Med Genet**. 2015 Nov;58(11):591-6..
5. Lambert AS, Grybek V*, Francou B*, Esterle L, Bertrand G, Bouligand J, Guiochon-Mantel A, Hieronimus S, Voitel D, Soskin S, Magdelaine C, Lienhardt A, Silve C, Linglart A. *Analysis of AP2S1, a calcium-sensing receptor regulator, in familial and sporadic isolated hypoparathyroidism.* **J Clin Endocrinol Metab. 2014**;99:E469-73.
6. Voican A, Bachelot A, Bouligand J, Francou B, Dulon J, Lombès M, Touraine P, Guiochon-Mantel A. *NR5A1 (SF-1) mutations are not a major cause of primary ovarian insufficiency.* **J Clin Endocrinol Metab. 2013** ;98:E1017-21.
7. Young J, George JT, Tello JA, Francou B, Bouligand J, Guiochon-Mantel A, Brailly-Tabard S, Anderson RA, Millar RP. *Kisspeptin restores pulsatile LH secretion in patients with neurokinin B signaling deficiencies: physiological, pathophysiological and therapeutic implications*. **Neuroendocrinology. 2013**;97:193-202.
8. Brioude F, Bouligand J, Francou B, Fagart J, Roussel R, Viengchareun S, Combettes L, Brailly-Tabard S, Lombès M, Young J, Guiochon-Mantel A. *Two families with normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism and*

biallelic mutations in KISS1R (KISS1 receptor): clinical evaluation and molecular characterization of a novel mutation. **PLoS One. 2013**;8:e53896.

9. Young J, Metay C, Bouligand J, Tou B, Francou B, Maione L, Tosca L, Sarfati J, Brioude F, Esteva B, Briand-Suleau A, Brisset S, Goossens M, Tachdjian G, Guiochon-Mantel *A. SEMA3A deletion in a family with Kallmann syndrome validates the role of semaphorin 3A in human puberty and olfactory system development.* **Hum Reprod. 2012**;27:1460-5.
10. Francou B, Bouligand J, Voican A, Amazit L, Trabado S, Fagart J, Meduri G, Brailly-Tabard S, Chanson P, Lecomte P, Guiochon-Mantel A, Young J. *Normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism due to TAC3/TACR3 mutations: characterization of neuroendocrine phenotypes and novel mutations*. **PLoS One. 2011**;6:e25614.
11. Brioude F, Bouligand J, Trabado S, Francou B, Salenave S, Kamenicky P, Brailly-Tabard S, Chanson P, Guiochon-Mantel A, Young J. *Non-syndromic congenital hypogonadotropic hypogonadism: clinical presentation and genotype-phenotype relationships*. **Eur J Endocrinol. 2010**;162:835-51.
12. Young J, Bouligand J, Francou B, Raffin-Sanson ML, Gaillez S, Jeanpierre M, Grynberg M, Kamenicky P, Chanson P, Brailly-Tabard S, Guiochon-Mantel A. *TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans*. **J Clin Endocrinol Metab. 2010**;95:2287-95.

Revue Générale

Bry-Gauillard H, Trabado S, Bouligand J, Sarfati J, Francou B, Salenave S, Chanson P, Brailly-Tabard S, Guiochon-Mantel A, Young J. *Congenital hypogonadotropic hypogonadism in females: clinical spectrum, evaluation and genetics*. **Ann Endocrinol (Paris). 2010**;71:158-62.

Chapitre de livre

Voican A, Francou B, Novac L, Chabbert-Buffet N, Canonico M, Meduri G, Lombes M, Scarabin PY, Young J, Guiochon-Mantel A and Bouligand J. (2012). *Pharmacology of Hormone Replacement Therapy in Menopause*, **Pharmacology**, Dr. Luca Gallelli (Ed.), ISBN: 978-953-51-0222-9, InTech.

Présentations Orales en congrès :

1. Young J, Bouligand J, Francou B, Raffin-Sanson ML, Gaillez S, Jeanpierre M, Brailly-Tabard S, Guiochon-Mantel A. TAC3 and TACR3 'knockouts' cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. **12ème Congrès Européen d'Endocrinologie (ECE), Prague, République Tchèque, avril 2010. (Communication orale, Highlights topics,**

H2.4).

2. Young J, Bouligand J, Francou B, Raffin-Sanson ML, Gaillez S, Jeanpierre M, Grynberg M, Kamenicky P, Chanson P, Brailly-Tabard S, Guiochon-Mantel A. TAC3 and TACR3 'knockouts' cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. **7th International Congress of Neuroendocrinology (ICN2010), Rouen, juillet 2010 (Communication orale, O-21).**

3. Young J, Bouligand J, Francou B, Raffin-Sanson M, Gaillez S, Jeanpierre M, Grynberg M, Kamenicky P, Trabado S, Chanson P, Brailly-Tabard S, Guiochon-Mantel A. L'invalidation de *TAC3* et de *TACR3* entraîne un hypogonadisme hypogonadotrope congénital d'origine hypothalamique chez l'homme. **27ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, 2010, Deauville (Communication orale, CO24). In Ann Endocrinol : 71, 341, CO24**.

4. Francou B, Bouligand J, Voican A, Amazit L, Trabado S, Fagart J, Meduri G, Brailly-Tabard S, Chanson P, Lecomte P, Guiochon-Mantel A, Young J. Normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism due to *TAC3/TACR3* mutations: prevalence, characterization of neuroendocrine phenotypes and novel mutations. **ENDO 11, The Endocrine Society's 93rd Annual Meeting, Boston, USA (Communication orale, OR05-1**).

5. Francou B, Bouligand J, Voican A, Amazit L, Trabado S, Fagart J, Meduri G, Brailly-Tabard S, Chanson P, Lecomte P, Young J, Guiochon-Mantel A. Prévalence des mutations de la neurokinine B et de son récepteur NK3R dans une cohorte de 193 patients présentant un hypogonadisme hypogonadotrope normosmique congénital isolé (nCHH). **28ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, 2011, Clermont-Ferrand (Communication orale, CO-11). *In :* Ann Endocrinol : 2011, 72, 340**.

6. Young J, George J, Francou B, Bouligand J, Tello J, Guiochon-Mantel A, Brailly-Tabard S, Anderson RA, Millar R La kisspeptine-10 restaure la sécrétion pulsatile des gonadotrophines chez des patients avec hypogonadisme hypogonadotrophique congénital (HHC) par mutations de la Neurokinine B (NKB) et de son récepteur NK3R. **28ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, 2011, Clermont-Ferrand (Communication orale, CO-42).** *In* : Ann Endocrinol : 2011, 72, 352.

7. Voican A, Bouligand J, Francou B, Lombès M, Touraine P, Guiochon-Mantel A. Variants of the *NR5A1* gene in a large cohort of patients with primary ovarian insufficiency. **First French-Romanian Clinical and Molecular Endocrinology Meeting, septembre 2011, Arad, Roumanie.**

8. Voican A, Bachelot A, Bouligand J, Francou B, Lombès M, Touraine P, Guiochon-Mantel A. Les mutations de NR5A1/SF1 ne sont pas une cause majeure d'insuffisance ovarienne primaire. **29ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, 2012, Toulouse (Communication orale, CO-14)**. *In* : Ann Endocrinol : 2012, 73, 256.

9. Paul C, Francou B, Brioude F, Raffin-Sanson M-L, Lombès M, Guiochon-Mantel A, Young J, Bouligand J. Caractérisation fonctionnelle de 6 variants originaux de *KISS1R* dans une cohorte de 640 patients atteints d'hypogonadisme hypogonadotrope congénital isolé.. **31ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, 2014, Lyon (Communication orale, CO-23).** *In* : Ann Endocrinol : 2014, 75, 271.

10. Bouligand J, Francou B, Imanci D, Nadal F, Young J, Guiochon-Mantel A. Apport du séquençage nouvelle génération pour le diagnostic moléculaire des hypogonadismes hypogonadotropes congénitaux. **31ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, 2014, Lyon (Communication orale, CO-45)**. *In* : Ann Endocrinol : 2014, 75, 282-283.

11. C Paul, B Francou, B Frederic, Ml Raffin-Sanson, M Lombes, A Guiochon-Mantel, J Young, J Bouligand. Caractérisation fonctionnelle de 6 variants originaux de *KISS1R* dans une cohorte de 640 patients atteints d'hypogonadisme hypogonadotrope congénital isolé**. 12èmes Journées Européennes de la Société Française de Gynécologie, 2014, Paris (communication orale)**.

12. Bouligand J, Francou B, Imanci D, Nadal F, Young J, Guiochon-Mantel A. Apport du séquençage nouvelle génération pour le diagnostic moléculaire des hypogonadismes hypogonadotropes congénitaux. **12èmes Journées Européennes de la Société Française de Gynécologie, 2014, Paris (communication orale)**.

13. B Francou, C Paul, B Frederic, Ml Raffin-Sanson, M Lombes, A Guiochon-Mantel, J Young, J Bouligand .“Caractérisation de variants KISS1R impliqués dans les Hypogonadismes Hypogonadotropes Isolés Congénitaux **Journee de L’IFR93/I2b 2014 (communication orale).**

14. B Francou, C Paul, , B Frederic, Ml Raffin-Sanson, M Lombes, A Guiochon-Mantel, J Young, J Bouligand. Journee Caractérisation de variants KISS1R impliqués dans les Hypogonadismes Hypogonadotropes Isolés Congénitaux. **Ecole Doctorale 419 2015"Signalisations et Réseaux Intégratifs en Biologie" (communication orale O6).**

15. Francou B, Imanci D, Cottin A, Proust A, Habib C, Bouvattier B, Brue T, Guiochon-Mantel A, Bouligand J, Young J. Forte prévalence de l’oligogénisme dans les hypogonadismes hypogonadotropes congénitaux (HHC)/Kallmann (KS) par séquençage nouvelle génération (NGS). **32ème Congrès Société Francaise d’Endocrinologie (SFE), Angers 2015. CO-035**

16. Francou B, Bouligand J, Kaloustian E, Kamenicky, Chabrolle C, Deleuze JF, Meyer V, Brailly-Tabard S, Chanson Ph, Guiochon-Mantel A, Young J. Hypogonadisme hypogonadotrophique (HH) familial avec syndrome cérébelleux. Découverte par Exome de mutations du gène Patatin-like Phospholipase Domain Containing 6. Relations génotype phénotype et caractérisation fonctionnelle. **32ème Congrès Société Francaise d’Endocrinologie (SFE), Angers 2015. CO-044** (*Prix de Communication Orale SFE / NOVARTIS 2015*)

17. Bouligand J, Cartes A, Francou B, Salenave S, Imanci D, Habib C, Proust A, Guiochon-Mantel A, Young J. Syndrome de Kallmann (SK) familial causé par une mutation frameshift du gène codant pour le Récepteur de type D de l'Interleukine 17. **32ème Congrès Société Francaise d’Endocrinologie (SFE), Angers 2015. CO-020**

18. Bernard V, Kherra S, Francou B, Fagart J, Viengchareun S, Ladjouze A, Guiochon-Mantel A, Binart N, Lombès M, Christin-Maitre S. Résistance aux œstrogènes due à une nouvelle mutation homozygote d’ESR1. **32ème Congrès Société Francaise d’Endocrinologie (SFE), Angers 2015**. **CO-050**

Présentations affichées en congrès :

1. Bouligand J, Young J, Francou B, Trabado S, Raffin-Sanson ML, Gaillez S, Jeanpierre M, Grynberg M, Kamenicky P, Chanson P, Brailly-Tabard S, Guiochon-Mantel A. Le « knock-out » de TAC3 et TACR3 entraîne un déficit gonadotrope d’origine hypothalamique chez l’homme. **Journée de la Recherche, Faculté de médecine Paris sud, 2010 (P58).**

2. Francou B, Bouligand J, Voican A, Amazit L, Brailly-Tabard S, Lecomte P, Young J, Guiochon-Mantel A. Normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism due to TAC3/TACR3 mutations: characterization of neuroendocrine phenotypes and novel mutations. **13ème Congrès Européen d’Endocrinologie (ECE), Rotterdam, Hollande, mai 2011 (poster P178)**.

3. Young J, George JT, Tello JA, Francou B, Bouligand J, Guiochon-Mantel A, Brailly-Tabard S, Anderson RA, Millar RP. Continuous Kisspeptin Infusion Restores Pulsatile LH Secretion in Patients with Neurokinin B Signaling Deficiencies, **ENDO 12, The Endocrine Society's 94rd Annual Meeting, Houston, USA (SUN-693).**

4. Francou B, Bouligand J, Voican A, Amazit L, Trabado S, Fagart J, Meduri G, Brailly-Tabard S, Chanson P, Lecomte P, Guiochon-Mantel A, Young J. Prévalence des mutations de la neurokinine B et de son récepteur NK3R dans une cohorte de 193 patients présentant un hypogonadisme hypogonadotrope normosmique congénital isolé (nCHH). **6èmes Assises de Génétique humaine et médicale, Marseille, 2012**.

5. Francou B, Guérin N, Borie C, Lautier B, Nouchy M, Tosca L,, Toujani S, Vaast V, Benachi A, Tachdjian G,, Brisset S. Etude prospective du diagnostic prénatal de microdélétion 22q11.2 impliquée dans le syndrome de DiGeorge par FISH sur noyaux interphasiques de cellules fœtales non cultivées. **6èmes Assises de Génétique humaine et médicale, Marseille, 2012**.

6. J. Young, C. Metay, J. Bouligand, B. Tou**, B. Francou**, L. Maione, L. Tosca, J. Sarfati, F. Brioude, B. Esteva, A. Briand, M. Goossens, G. Tachdjian, A. Guiochon-Mantel. SEMA3A deletion in a family with Kallmann syndrome validates the role of semaphorin 3A in human puberty and olfactory system development. **15th International Congress of Endocrinology (ICE) and 14th European Congress of Endocrinology ECE, Florence 2012. *Endocrine Abstracts* (2012) 29 P1098**

7. Voican A, Bachelot A, Bouligand J, Francou B, Lombès M, Touraine P, Guiochon-Mantel A variants of the *NR5A1* gene in a large cohort of patients with primary ovarian insufficiency. **15th International Congress of Endocrinology (ICE) and 14th European Congress of Endocrinology ECE, Florence 2012 (P925). *Endocrine Abstracts* (2012) 29 P925.**

8. Brioude F, Bouligand J, Francou B, Roussel R, Viengchareun S, Combettes L, Brailly-Tabard S, Lombès M, Young J, Guiochon-Mantel A. *KISS1R* mutations in normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism: clinical evaluation of two families and molecular characterization of a novel mutation **15th European Congress of Endocrinology ECE 2013, Copenhague** *Endocrine Abstracts* (2013) 32 P637.

9. Voican A, Bachelot A, Bouligand J, Francou B, Lombès M, Touraine P, Guiochon-Mantel A. Les mutations de NR5A1/SF1 ne sont pas une cause majeure d'insuffisance ovarienne primaire. **7èmes Assises de Génétique humaine et médicale, 2014, Bordeaux**.

10. Oliveira C, Imanci D, Boucly I, Dupuis E, Lamour L, Bouligand J, Proust A, Boutron A, Davit-Spraul A, Slama A, Guiochon-Mantel A, Francou B. Mise en place d'une plateforme robotisée au sein d'un laboratoire de génétique moléculaire appliquée au génome humain. **7èmes Assises de Génétique humaine et médicale, 2014, Bordeaux**.

11. Francou B, Imanci D, Cottin A, Proust A, Habib C, Bouvattier B, Brue T, Guiochon-Mantel A, Bouligand J, Young J. Forte prévalence de l'oligogénisme dans les hypogonadismes hypogonadotropes congénitaux (HHC)/Kallmann (KS) par séquençage nouvelle génération (NGS). **8ème Assises de Génétique, Lyon, 2016. #3055**

12. Bouali N, Francou B, Bouligand J, Malek I, Kammoun M, Warszawski J, Mougou S, Saad A, Guiochon-Mantel A. Prévalence des mutations du gène NOBOX dans une cohorte de 100 patientes Tunisienne atteintes d'IOP. **8ème Assises de Génétique, Lyon, 2016. #3049**

13. Bouali N, Francou B, Bouligand J, Lakhal B, Malek I, Kammoun M, Warszawski J, Mougou S, Saad A, Guiochon-Mantel A. Etude des gènes associés à l'IOP dans une cohorte de 125 femmes d'origine Tunisienne: NOBOX est le principal gène autosomique impliqué. **32ème Congrès Société Francaise d'Endocrinologie (SFE), Angers 2015**. **PA-054**

ÉCOLE DOCTORALE
Signalisation et réseaux intégratifs en biologie (BIOSIGNE)

Titre : Contribution à la caractérisation de nouveaux gènes impliqués dans les hypogonadismes hypogonadotropes : caractérisation des mécanismes moléculaires et cellulaires

Mots clés : hypogonadisme, Kallmann, GnRH, kisspeptine, caractérisation fonctionnelle, génétique

Résumé : Les hypogonadismes hypogonadotropes congénitaux (CHH) sont des maladies héréditaires caractérisées par un déficit de sécrétion des gonadotrophines par l'hypophyse, à l'origine d'une infertilité ou d'une absence complète de puberté. On distingue les formes isolées avec olfaction normale (nCHH) et les formes syndromiques associant au déficit gonadotrope d'autres signes, tel qu'un défaut d'olfaction dans le cas du syndrome de Kallmann (SK), la forme plus fréquente de CHH. Les gènes identifiés dans le SK participent au développement embryonnaire et les gènes des nCHH sont impliqués dans la régulation de la sécrétion de la GnRH ou de son action. A ce stade, deux populations de neurones hypothalamiques gonadotropes sont connues, le neurone à GnRH et le neurone KNDy, sécrétant les Kisspeptines et la Neurokinine B. On estimait que l'ensemble des gènes identifiés couvraient moins de 20% des étiologies génétiques. **L'objectif de ce doctorat** était d'étudier prévalences et mécanismes physiopathologiques des gènes connus et d'identifier de nouvelles étiologies génétiques de CHH. **Dans la première partie**, nous avons caractérisé la fonctionnalité de tous les variants identifiés sur les gènes *KISS1R, TACR3* et *TAC3.* Cela a permis de préciser les prévalences chez 600 patients, d'identifier un profil neuroendocrinien propre à l'altération de la signalisation Neurokinine B et de démontrer l'implication des Kisspeptines au cours de la vie embryonnaire. Enfin, nous proposons un modèle d'interaction entre le neurone à GnRH et le neurone KNDy. **Dans la seconde partie**, nous avons identifié deux nouveaux gènes, *SEMA3A* dans une forme familiale de SK et *PNPLA6* dans une forme familiale rare de CHH syndromique. **En conclusion**, notre connaissance accrue des formes génétiques de CHH, a permis de développer un panel d'exome ciblé dédié au diagnostic par séquençage nouvelle génération permettant l'analyse simultanée de gènes candidats et de gènes connus.

Title : Contribution to the characterization of new genes involved in the hypogonadotropic hypogonadism: characterization of molecular and cellular mechanisms

Keywords : hypogonadism, Kallmann, GnRH, kisspeptine, functional characterization, genetics

Abstract : Congenital hypogonadotropic hypogonadism (CHH) is characterized by deficient or absent pubertal development due to deficient or absent secretion of the pituitary gonadotropins. The many known genetic causes are generally classified into distinct nosological groups. One comprises abnormalities that affect the pre-natal development or migration of GnRH neurons, the paradigm of which is Kallmann syndrome. The other encompasses molecular abnormalities that only affect hypothalamic GnRH synthesis, GnRH release or GnRH signaling at pituitary level. At this stage, two populations of hypothalamic neurons implicated in a gonadotrop function are identified, GnRH neurons and KNDy neurons secreting kisspeptins and neurokinin B. All of the identified genes would represent less than 20% of genetic etiologies. **The aim of this PhD** was to study the prevalence and pathophysiology mechanisms of. known genes and to identify new genetic etiologies of CHH. **In the first part**, we characterized the function of all molecular events identified on *KISS1R*, *TACR3* and *TAC3* genes. Prevalences were estimated in 600 patients. A particular neuroendocrine profile was identified in patients presenting an alteration of neurokinin B signaling. Importance of Kisspeptins during embryonic life was validated. According to these data, a model of interaction between GnRH and KNDy neurons was proposed. **In the second part**, we identified two new CHH genes using various molecular genetics approaches. *SEMA3A* was identified in a familial form of Kallmann syndrome and *PNPLA6* in a rare familial form of CHH. **Finally**, our increased knowledge of the various genetic forms of CHH allows proposing a new genetic approach based on next generation sequencing to test together all known and several candidate genes.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France