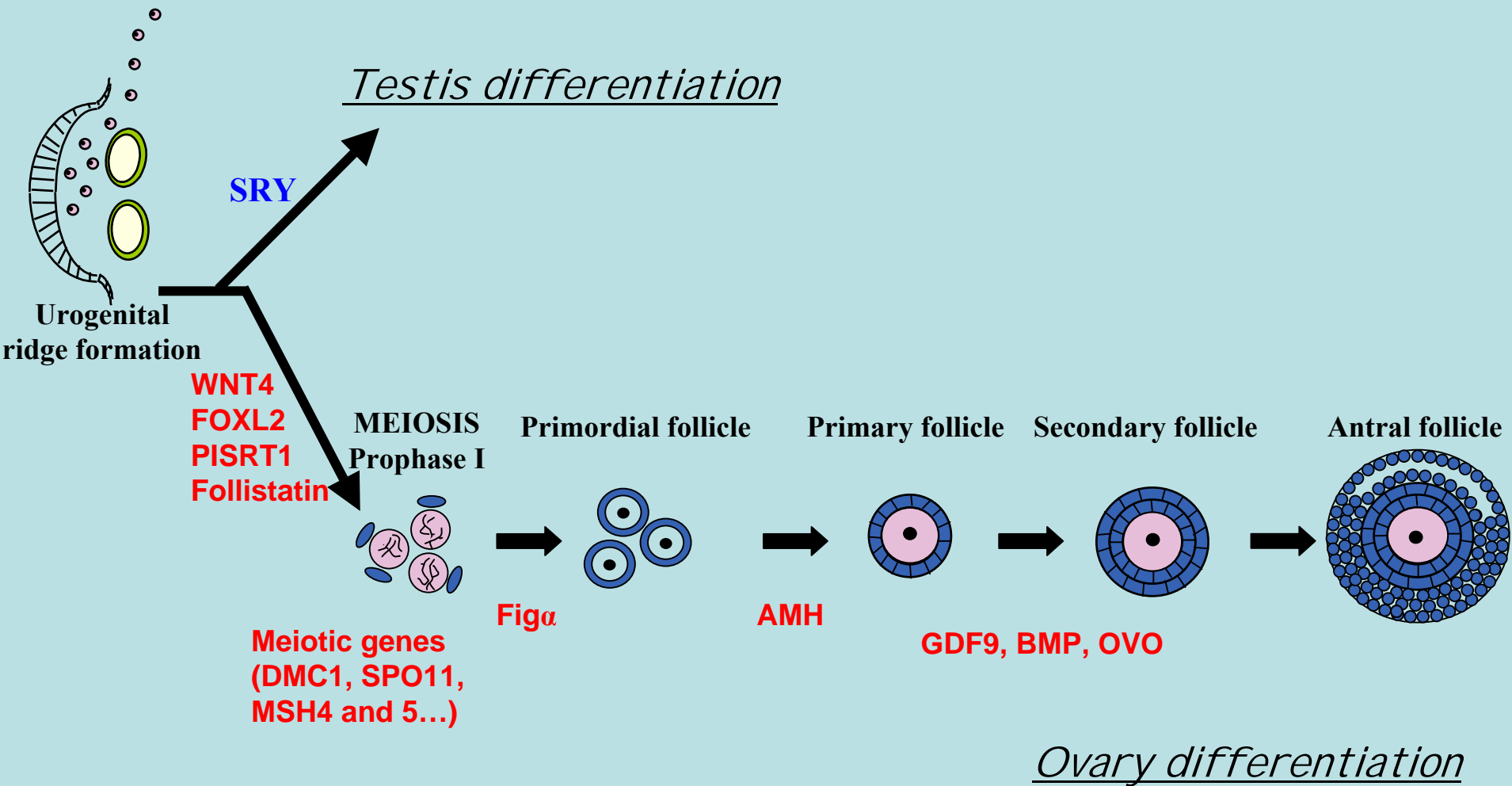


Analyse génétique des Insuffisance Ovariennne Prématurée: IOP

1) Approches Gènes candidats



Female specific genes in the developing ovary.

Infertilité mâle et gènes de méiose

Gène	Fonction de la protéine	Localisation humaine	Phénotype mutant		
			Mâle %	Femelle %	Phénotype des gonades
DMC1 (Disrupted Meiotic cDNA1)	Réparation de l'ADN Appariement homologues et échange d'ADN entre les chromosomes pendant la méiose	22q12-13	Stérile	Stérile	Arrêt de gamétogenèse en prophase I: blocage de la méiose au stade zygotène précoce et apoptose
Msh4 (MutS homologue 4)	Synthèse d'ADN	1p31	Stérile	Stérile	Défaut d'appariement pendant la méiose
Msh5 (MutS homologue 5)	Synthèse d'ADN Réparation des mésappariements de l'ADN	6p21.2-22.1	Stérile	Stérile	Non appariement des chromosomes en prophase I. Diminution de la taille testiculaire et perte complète des structures ovariennes
SPO11	Initiation de la recombinaison méiotique	20q13.2-13.3	Stérile	Stérile	Structures des chromosomes modifiées Erreur de recombinaison
Cycline A1	Première division méiotique mâle	13q12.3-13	Stérile	Fertile	Arrêt de spermatogenèse avant la 1ère division méiotique d'où apoptose. Défaut d'appariement des chromosomes. Réduction de l'activation de la kinase Cdc2 (protéine cible de CCNA1) en fin de prophase I.

Échantillons d'ADN

- 44 femmes:** Caryotype normal
Insuffisance ovarienne précoce (sans BPES)
Aménorrhée primaire ou secondaire
18 à 31 ans
- 101 hommes:** Caryotype normal
Aucune micro-délétion sur Y
Azoospermie
- 36 témoins:** Familles asthmatiques fertiles obtenues par le CNG

Résultats

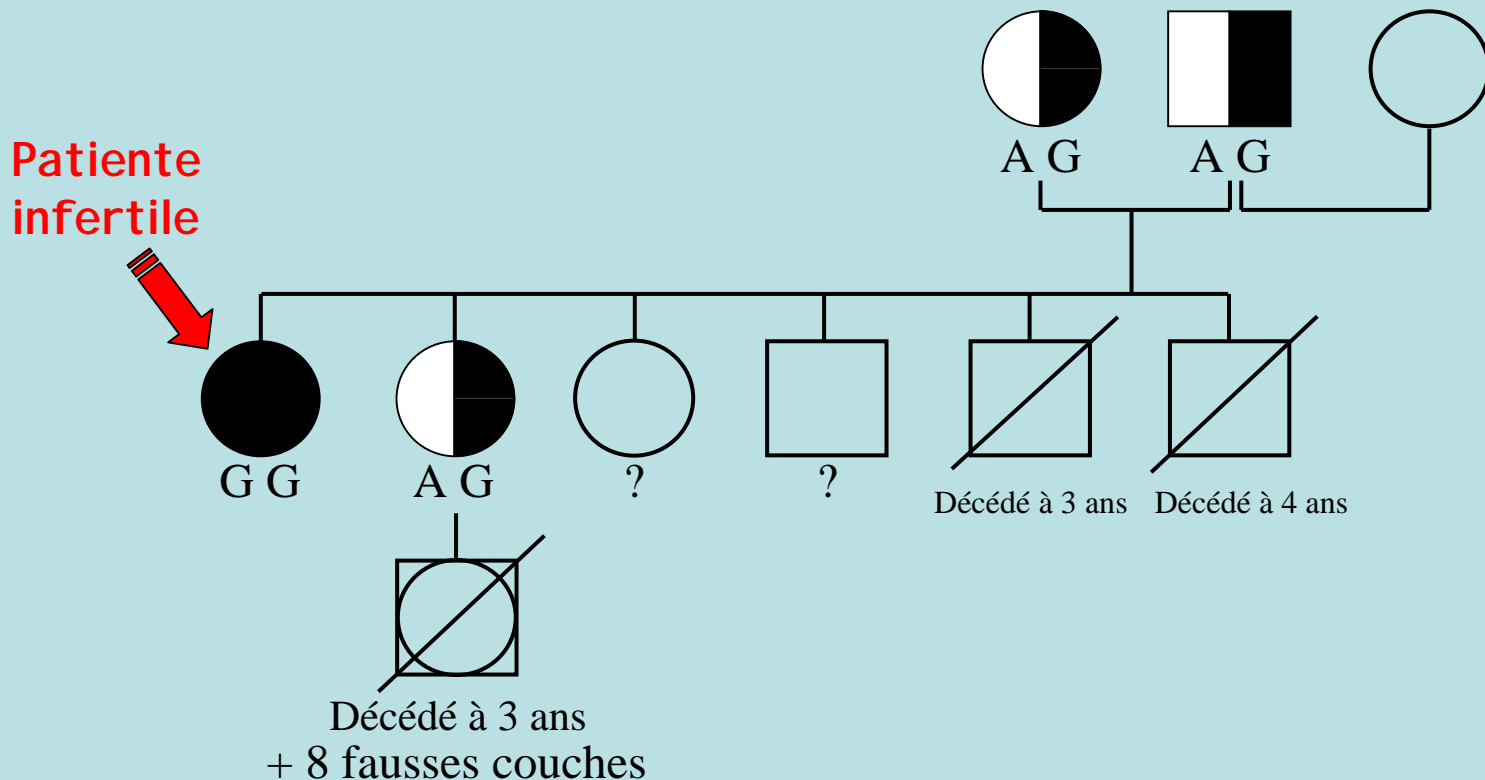
9 mutations hétérozygotes avec changement d'acide aminé.

2 mutations homozygotes avec changement d'acide aminé:

GENE	n° exon	SNP (normal/muté)	Codon (normal/muté)	Acide aminé (normal/mut é)	Sexe du patient
DMC1	9	SNP(A/G)	ATG/GTG	M/V	Femelle
MSH4	20	SNP(G/A)	AGT/AAT	S/N	Mâle

Mutation DMC1

- Séquençage de 32 personnes d'origine sénégalaise:
 - 30 **Homo**zygotes non porteurs de la mutation (A/A)
 - 2 **Hétéro**zygotes porteurs de la mutation (A/G)
- Séquençage de la famille de la patiente:





Examiner leurs conséquences et vérifier l'implication en clinique.

Approches expérimentales complémentaires:
mutations reproduites
chez des organismes modèles:
Levure SC

Conclusion

La présence d'une mutation T c (M/V) au niveau d'un aa conservé dans le gène DMC1 n'a pas de conséquences fonctionnelles pour le déroulement de la méiose chez la **Saccharomyces Cerevisae** mais Infertilité chez **Saccharomyces Pombe!**

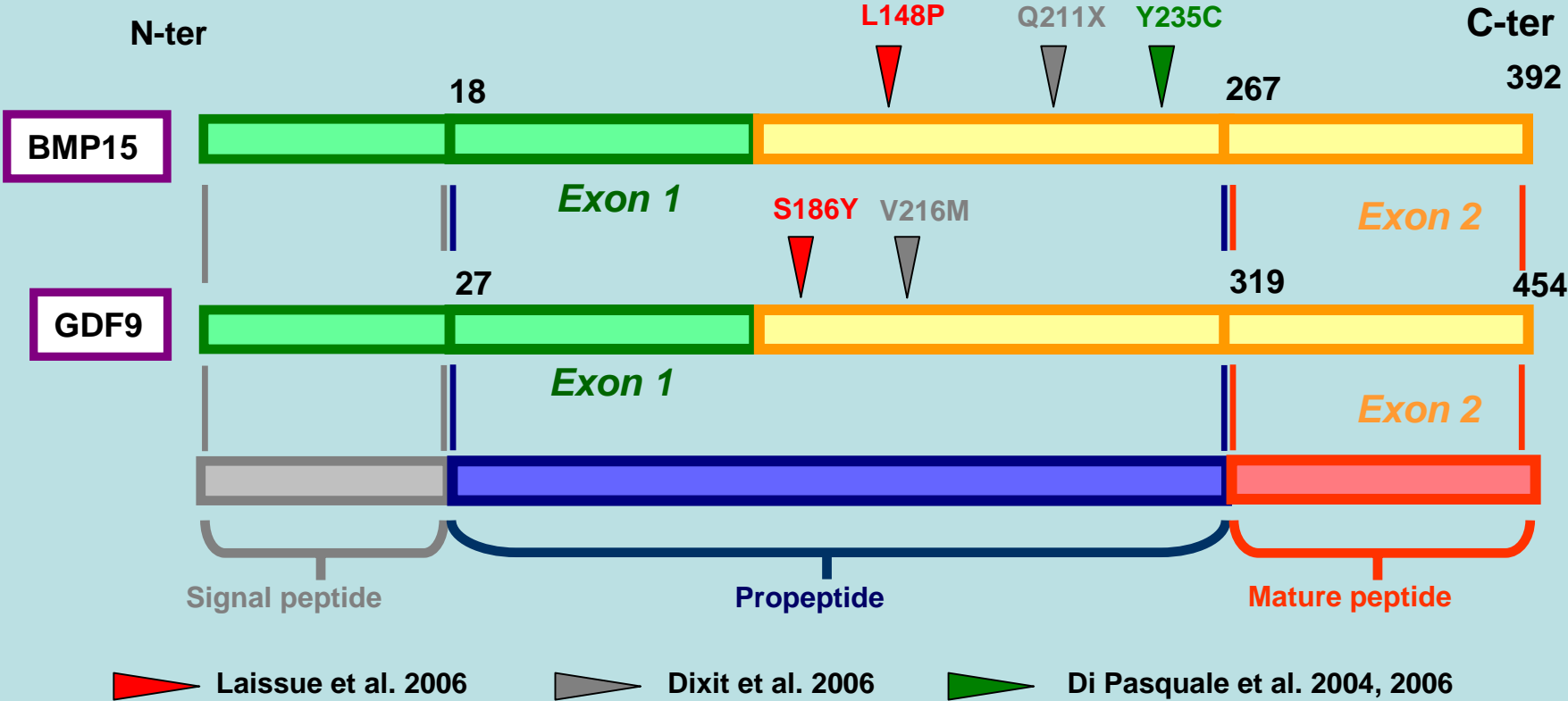
Analyse Gènes Candidats

Etude des gènes *BMP15*, *GDF9* et

CONNEXINES 37,43

**chez 165 patients IOP non
syndromique**

Summary of BMP15 and GDF9 mutations described in POF patients revealing a potential pathogenic effect



Sequence analysis of Connexins 37 and 43 in non syndromic POF patients

Preliminary Results

Gene	Sequence variation	AA change	SIFT	Frequency
Connexin 37 (1p35)	c.388G>A	p.Val130Ile	0,1	31/114
	c.394C>T	p.Arg132Cys	0,1	3/114
	c.742G>A	p.Ala248Thr	0,98	1/114
	c.946G>A	p.Gly316Ser	0,7	1/114
	c.955C>T	p. Pro319Ser	0,98	69/114
Connexin 43 (6q21)	c.758C>T	p.Ala253Val	0,19	3/104

→ Study functional assays

Conclusions

Les “mutations” de **CNN 37,43** ; **BMP15** et **GDF9** peuvent être associées au phénotype mais ne sont pas une cause fréquente de IOP non syndromique

Le syndrome Blepharophimosis

(Blepharophimosis-Ptosis-Epicanthus Syndrome)

- syndrome autosomal dominant

→ **type I** : malformation des paupières associée à une infertilité féminine

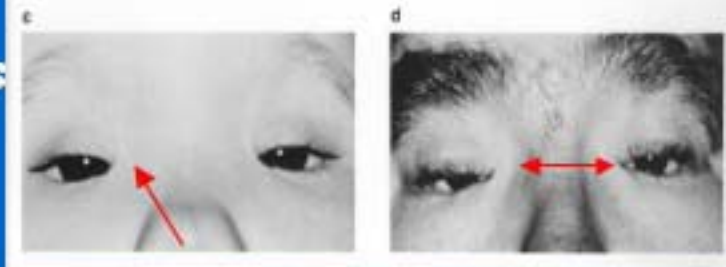
→ **type II** : malformation des paupières isolée

Blepharophimosis



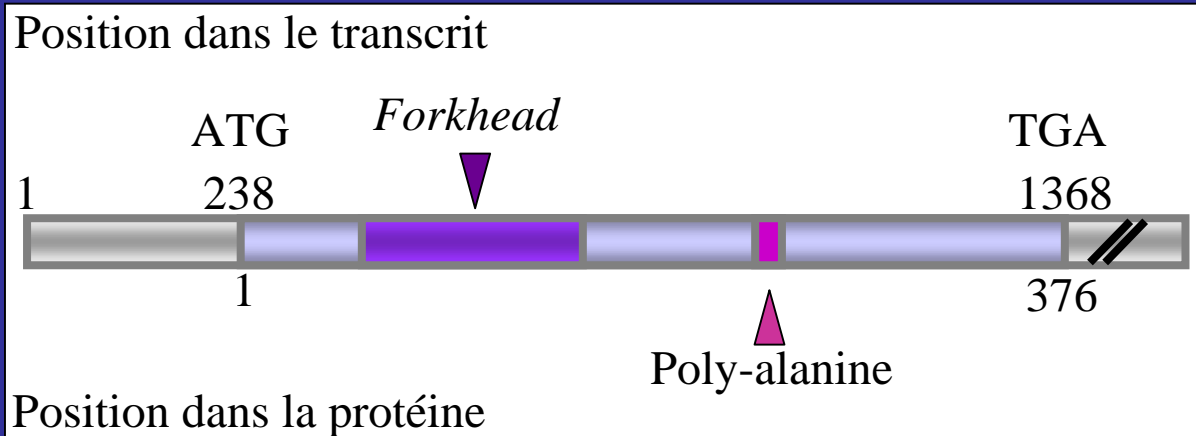
Ptosis

Epicanthus inversus



Telecanthus

Les mutations de *FOXL2* sont responsables du BPES (Crisponi *et al.* 2001)

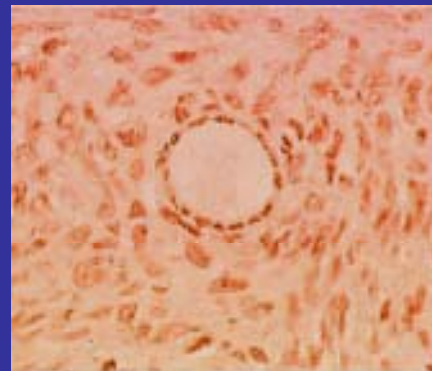


- Facteur de transcription à domaine « *forkhead* »
- Domaine poly-Alanine conservé parmi les mammifères

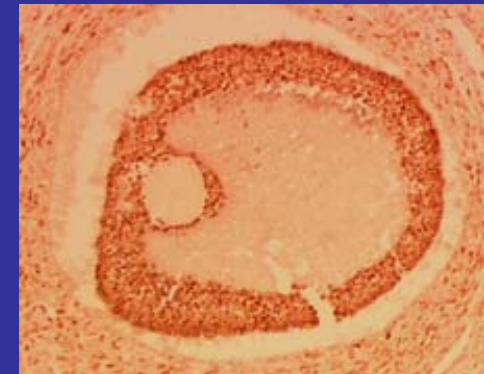
Expression de *FOXL2* (Cocquet *et al.* 2002)



Expression péri-oculaire



Follicule primaire



Follicule pré-ovulatoire

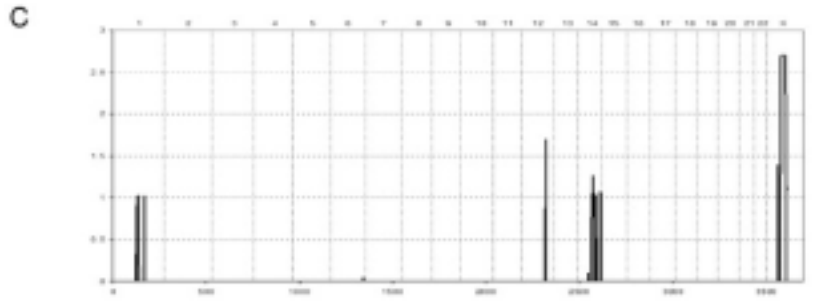
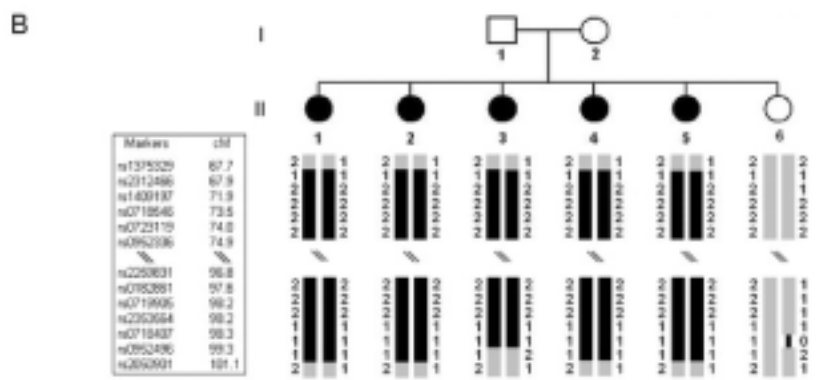
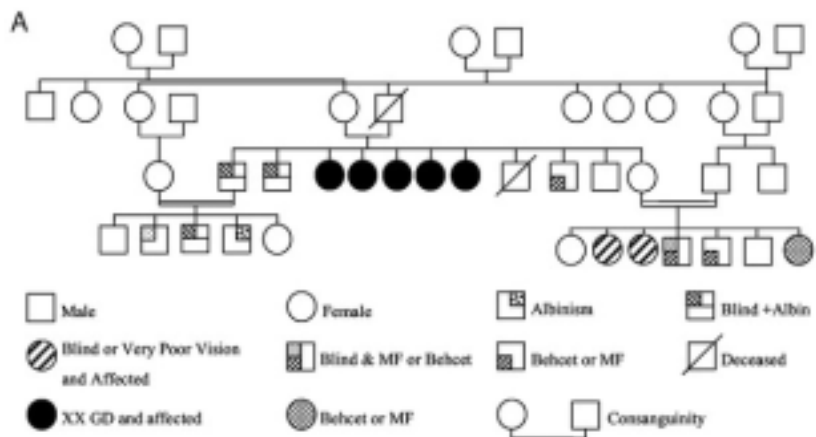
Expression de *mFOXL2* dans l'hypophyse (Kiussi *et al.* 1999)

Analyse génétique des Insuffisance Ovariennne Prématurée: IOP

2) Approches Mendeliennes

Disruption of POF1B Binding to Nonmuscle Actin Filaments is Associated with POF

Arnaud Lacombe *et al* Eric Vilain, *Am. J. Hum. Genet.* 79:113-119, 2006

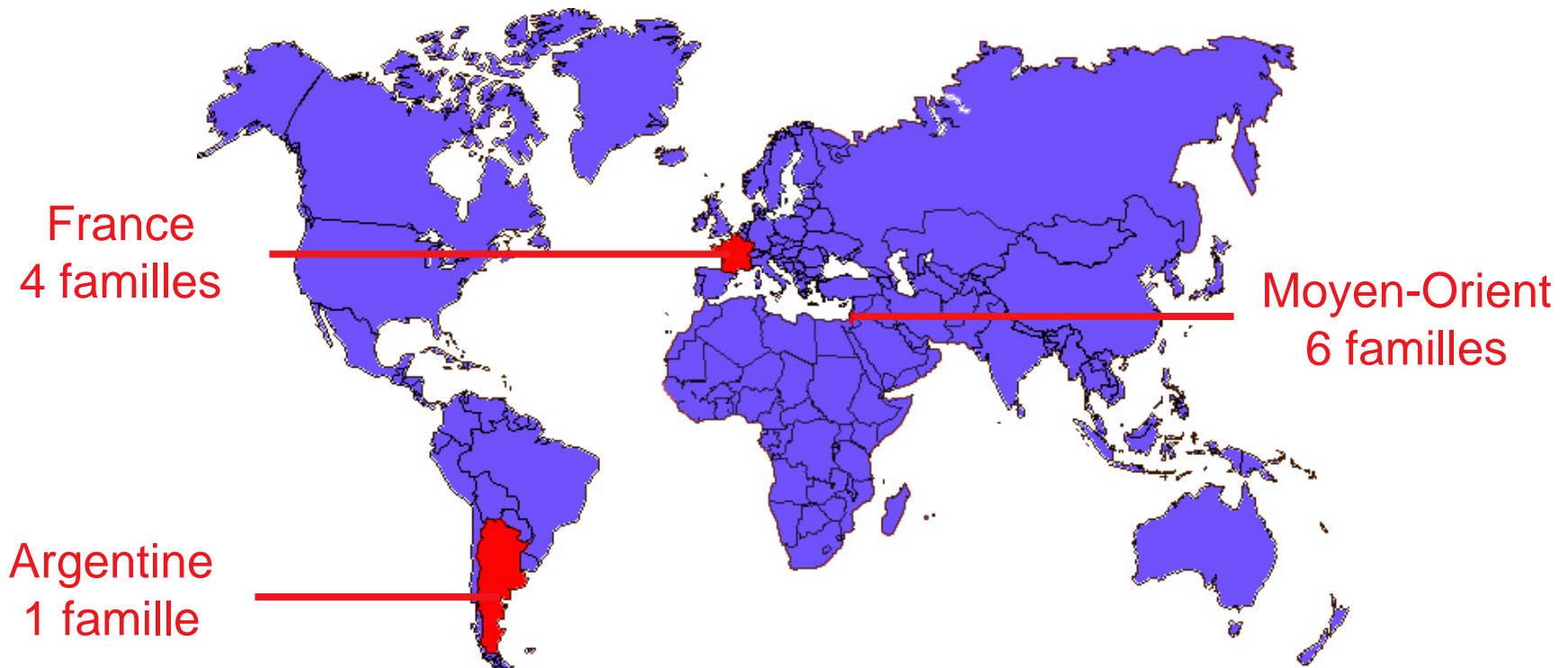


The locus of linkage was localized to the long arm of the X chromosome (genomic region between Xq21.1 and Xq 21.3.3), corresponding to a 21-Mb region

Cas familiaux d'Insuffisance Ovarienne Prématurée

Réseau international de collecte de patientes IOP

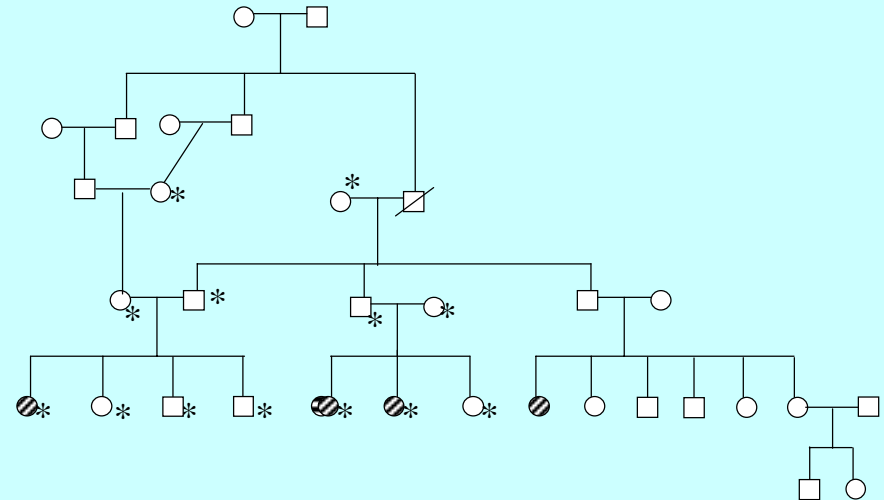
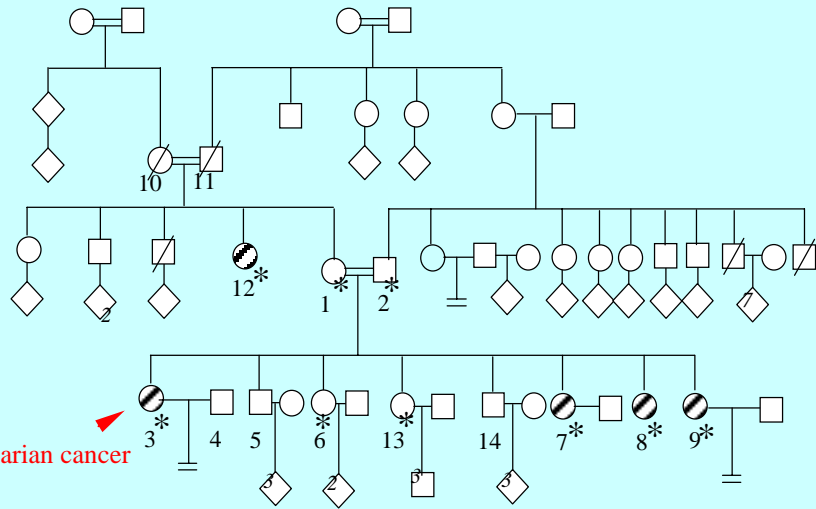
- IOP vraie
- au moins 2 cas d'IOP dans la famille



POF Family (East JERUSALEM)

MO1DA

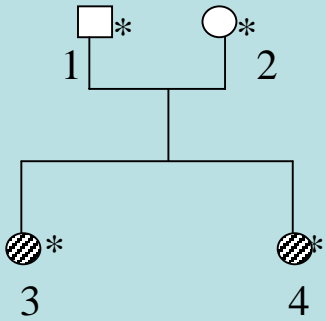
MO2GO Family



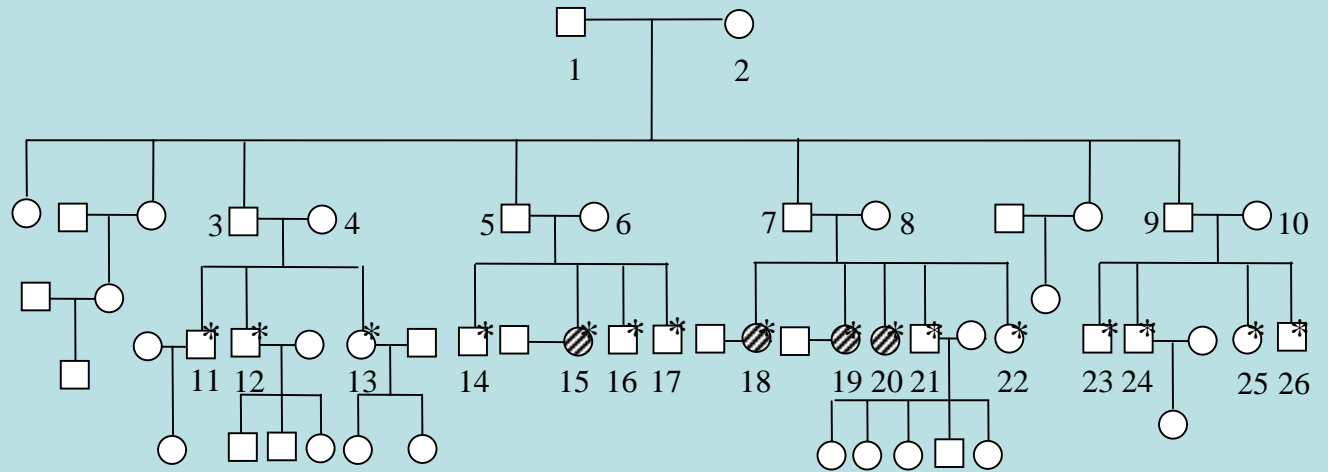
- ⊘ POF Patients
- ⊚ Neuromuscular disease
- * Available DNA

POF Families - France

Family FR3SJ

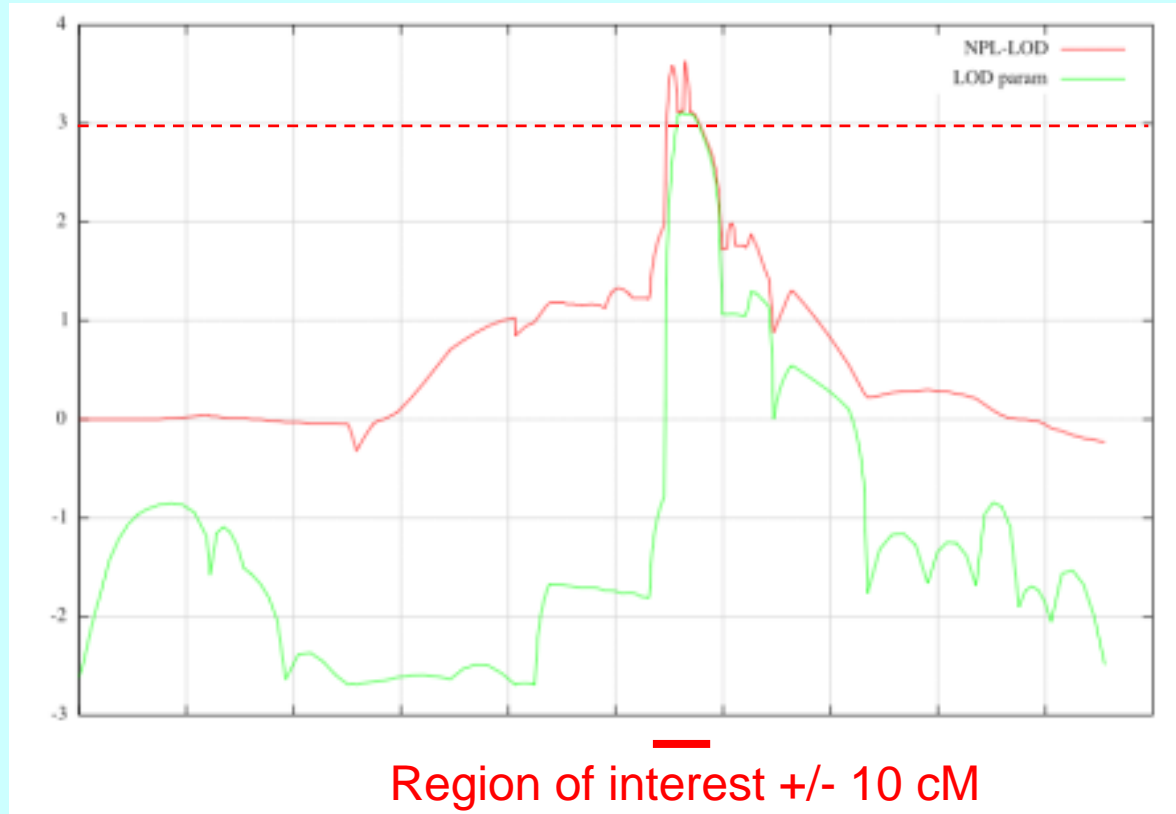


Family FR4DA



Genome-wide scanning in familial cases

Second scan of the 7q region



On Chromosome 7

MOUSE MODELE FOR PREMATURE OARIAN FAILURE

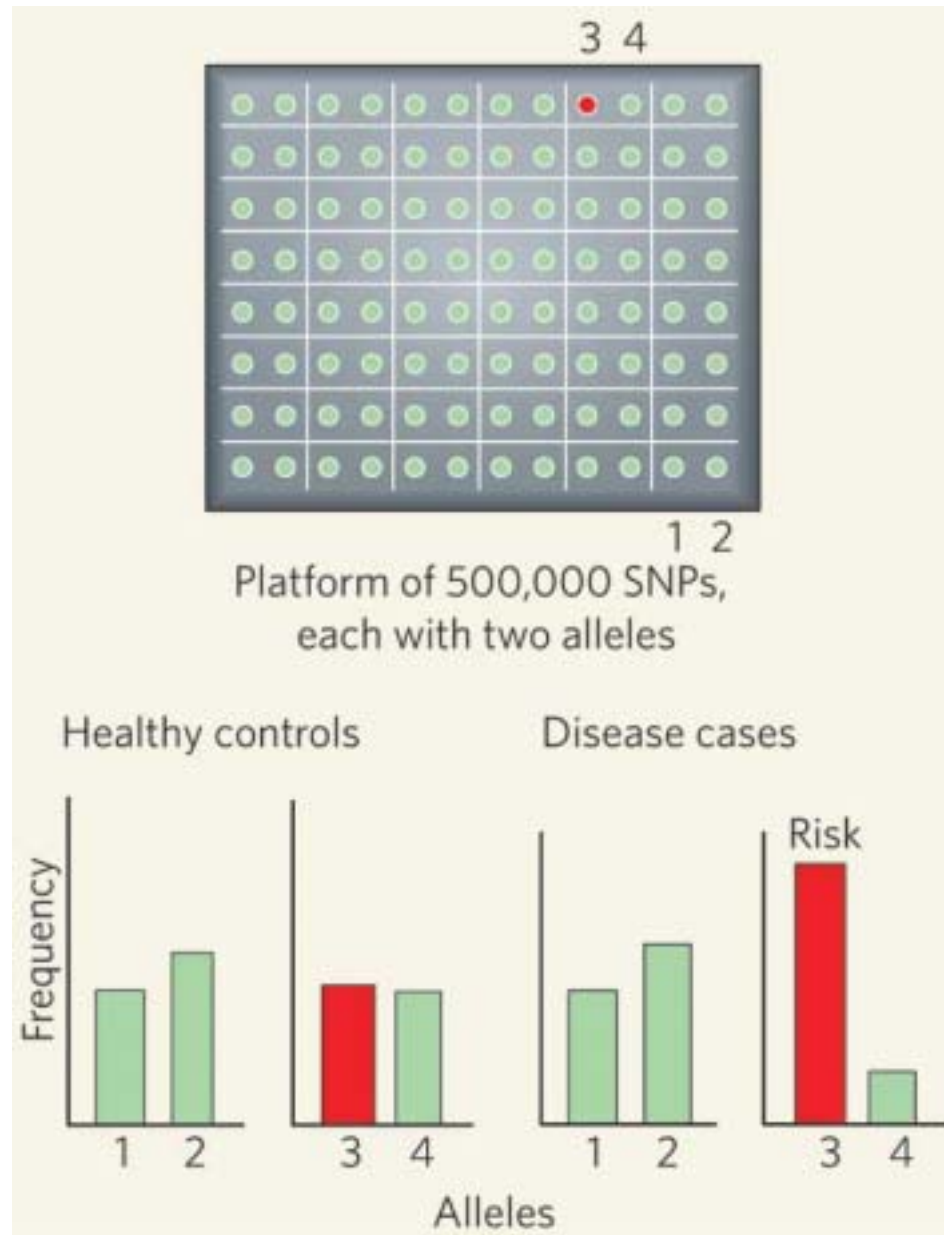
Mutant gene	Mapping mouse/ Human	Reproductive phenotype
<i>Adams1</i> (a disintegrin like and mettaloprotease with thrombospondin type 1 motif.1)	16/21q	Cystic formation in uteri; defects in preovulatory follicle development
Alpha 1 microglobulin/bikunin (<i>Ambp</i> ; Urinary trypsin inhibitor)	4/9q	Defects in ovulation and cumulus-oocytes complex integrity
Aryl-hydrocarbon receptor (<i>Ahr</i>)	12/7p	Early development of primordial follicles; decreased numbers of antral follicles
Acivin receptor-like kinase2 (<i>ACV21</i>)	2/2q	Absence of PGC (Pluripotent Germ Cells)
Ataxia telangiectasia (<i>Atm</i>)	9/11q	Germ cells degenerate; disruptions evident in meiosis I
<i>Bmp15</i>	X/Xp	Defects in cumulus-oocyte complex formation and ovulation
<i>Bmp 2b</i> <i>Bmp 4</i> <i>Bmp 8b</i> <i>SMAD1</i> <i>SMAD5</i>	8/4q 13/5q 4/1p 2/20p 14/14q	Absence of PGC (Pluripotent Germ Cells)
Connexin 37 (<i>Gja4</i> ; <i>Cx37</i>)	4/1p	Defects in late folliculogenesis and oocyte meiosis
Connexin 43 (<i>Gja1</i> ; <i>Cx43</i>)	10/6q	Small ovaries and testes; decreased numbers of germ cells from E11.5
<i>Figla</i> or FIG α	6/2p	No primordial follicles develop at birth
Growth differentiation factor-9 (<i>Gdf9</i>)	11/5q	Folliculogenesis arrest at the one-layer follicle stage
FSH hormone β -subunit (<i>Fshb</i>)	2/11p	Female pre-antral block in folliculogenesis; males decreased testis size
Follistatin (<i>Fst</i>)	Female 13/5q	Decreased ovarian follicule
FSH receptor (<i>Fshr</i>)	17/2p	Female pre-antral block in folliculogenesis; males decreased testis size
<i>Foxl2</i>	9/3q	Defect of primordial follicule maturation
Homeobox factor nobox	6/7q	Defect in follicular activation, growth
Inhibin α (<i>Inha</i>)	1/2q	Granulos/Sertoli tumors, gonadotropin hormone-dependent
Insulin-like growth factor 1 (<i>Igf1</i>)	10/12q	Hypogonadal and infertile; disrupted spermatogenesis and vestigial ductal development

MOUSE MODELE FOR PREMATURE OVARIAN FAILURE(suite).

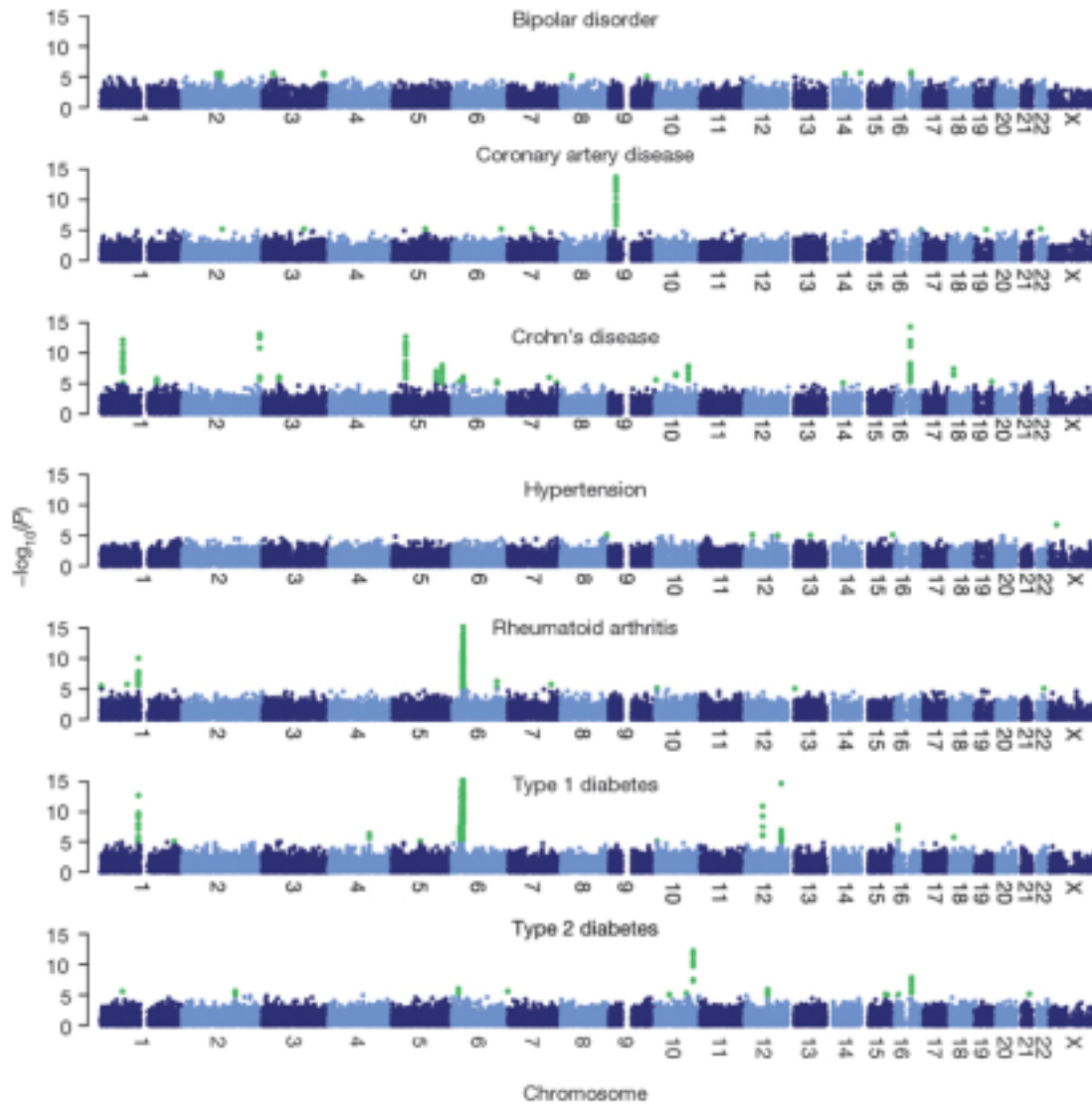
Kit receptor (<i>Kit</i>)	10/12q	<i>White spotting</i> null mutation causes PGC defects
Leptin (<i>Lep;oblob</i>) mutant	6/7q	Obese and infertile with hypogonadotropic hypogonadism
Leptin receptor (<i>Lepr;db/db</i>) mutant	4/1p	Obese and infertile with hypogonadotropic hypogonadism
Luteinizing Hormone Receptor (<i>Lhcgr</i>)	17/2p	Underdeveloped sex organs and infertility in both males and females; spermatogenesis arrested at round spermatid stage; preantral folliculogenesis block
<i>Msh4</i> (MutS homologue4)	3/1p	Prophase I meiotic defects apparent at the zygotene/pachytene stage; germ cells lost within a few days post-partum
<i>Msh5</i> (MutS homologue 5)	17/6p	Zygotene/pachytene meiotic defects with aberrant chromosome synapsis and apoptosis
Nuclear receptor co-repressor RIP40 (<i>Nrip1</i>)	16/21q	Ovulation defect; ovaries accumulate Luteinized, unruptured follicles
Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1 (<i>Nr5a1</i>); Steroidogenic factor-1 (SF-1)	19/11q	Gonadal agenesis in both sexes
<i>Oct4 Nano3</i>	17/6p	Increased apoptosis of PGC
Peptidyl-prolyl isomerase (<i>Pin1</i>)	9/19p	Defect in proliferation of PGC
<i>prdm1</i>	10/6q	Absence of PGC
Stromal cell-derived factor 1 (<i>Sdf1</i>)	6/10q	Defect of migration of PGC
<i>Sycp3</i> (synaptonemal complex protein 3)	10/12q	Defects in chromosome synapsis during meiosis; germ cell apoptosis in males; embryonic loss in females due to aneuploidy
<i>Taf4b</i> (TAF4B RNA polymerase II, TATA box binding protein-associated factor; TAFII105)	18/18q	Defects in follicular development, oocyte maturation/fertilization
Wingless-related MMTV integration site 4 (<i>Wn14</i>)	11/1q	Ovaries depleted of oocytes; Mullerian ducts not form
<i>Zfx</i> (Zinc finger protein X-linked)	X/Xp	Reduced germ cell numbers; males have reduced sperm, but are fertile; females subfertile
Zona pellucida protein 1 (<i>Zp1</i>)	19/11q	Defects in fertilization
<i>Zp2</i>	7/16p	Fragile oocytes with defects in developmental competence
<i>Zp3</i>	5/7q	Fragile oocytes

3) Genome-wide association scan

Genome-wide association scan.



Genome-wide scan for seven diseases



Génétique de l'infertilité chez l'Homme: conclusions

- L'approche mendélienne est la plus prometteuse.
Il existe bien des formes familiales d'infertilité, malgré le phénotype stérilité F
- L'approche gène candidat permet de caractériser les très cas rares d'infertilité F
- Importance des modèles animaux (souris) pour découvrir des gènes candidats
- Grande difficulté pour valider un gène découvert par une approche systématique ou analyse de famille
 - expression dans les gonades: cellules germinales ou somatiques
 - tester la mutation trouvée dans un organisme modèle (souris, levure...)
- Cependant dans la majorité des cas d'infertilité, aucune cause génétique n'est retrouvée: maladie complexe composante génétique/environnement:
projet d'analyse pangénomique global(GWA)
- Importance de la découverte d'une cause génétique pour l'aide au diagnostique le conseil génétique du couple

Merci a:

- Sandrine Caburet ,Paul Laissue,Reiner Veitia
Inserm Team 21 Daniel vaiman
Institut Cochin Institut Alfred Jost,Paris

-S.Christin-Maitre ,P.Bouchard: **Dept Endocrinology,H. Saint Antoine. Paris**

- F.Kutten,P.Touraine,**Endocrinology/ReproductiveMedicine,H. Pitié ,Paris**

- Beatrice Pepin ,Corinne Cotinot :**Inra**

- *Stavit Shalev et Al.* **Genetic unit Haemek Hospital Afula**

-*Ziva Ben-Neriah et Al,* : **Dept of Human Genetics, Kiriat Hadassah, Ein-Karem.**

- Doron Lancet , Edna BenAsher, Tsviya Olender, **Weizmann Institute of Science**

Zellinka DianaSimon Heath, Mark Lathrop : **CNG, Evry, France**

