

ANALYSES CYTOGÉNÉTIQUES CHEZ DES PATIENTES ATTEINTES D'INSUFFISANCE OVARIENNE PRÉMATURÉE (IOP)



LABORATOIRE DE CYTOGÉNÉTIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRE

CHU RENNES - PR JAILLARD S. - PR BELAUD-ROTUREAU MA.

TECHNICIENNES DE LABORATOIRE : ALIX S. - BELLEC M. - GUICHAOUA M. - LEROUX D.



➤ Introduction

➤ Historique de la cytogénétique

➤ Résolution des techniques de cytogénétique

➤ Techniques

- Caryotype
- FISH (Hybridation *In Situ* en Fluorescence)
- ACPA (Analyse Chromosomique sur Puce à ADN)
- Séquençage à Haut Débit : Exome

➤ Conclusion



Pôle de Biologie

Chef de Pôle : Pr Jean-Pierre GANGNEUX (PU-PH)

Service de Cytogénétique et Biologie Cellulaire

Chef de Service : Pr Marc-Antoine BELAUD-ROTUREAU (PU-PH)

UF 3039 – Recherche et Valorisation CYGAP

Responsable : Pr Marc-Antoine BELAUD-ROTUREAU (PU-PH)

Ingénieur : Bénédicte NOUYOU

UF 3040 – Moyens communs

Responsable : Pr Marc-Antoine BELAUD-ROTUREAU (PU-PH)

UF 3045 – Cytogénétique constitutionnelle

Responsable : Pr Sylvie JAILLARD (PU-PH)

Biologistes : Pr Marc-Antoine BELAUD-ROTUREAU (PU-PH)

Dr Frédéric DUGAY (MCU-PH)

Dr Catherine HENRY (PH)

Dr Saloua TOUJANI (PH)

Dr Erika LAUNAY (PH)

Dr Laura MARY (PH)

Dr Anna LOKCHINE (AHU)

UF 3047 – Cytogénétique des tumeurs

Responsable : Dr Catherine HENRY (PH)

Biologistes : Pr Marc-Antoine BELAUD-ROTUREAU (PU-PH)

Dr Florian CABILLC (MCU-PH)

Dr Frédéric DUGAY (MCU-PH)

Dr Saloua TOUJANI (PH)

Dr Erika LAUNAY (PH)

UF 3049 – Biologie Cellulaire

Responsable : Dr Florian CABILLC (MCU-PH)

Encadrement

Cadre Supérieure de Santé : Fanny PREVILLE

Cadre gestionnaire : Valentine DRUILLET

Faisant-fonction cadre de proximité : Bastien LARRIBOT

Responsable des secrétariats médicaux : Stéphanie POUSSET

Ingénieur

Bénédicte NOUYOU

Secrétaires

Isabelle MEURIEL

Claudine PERRUGAULT

Aide de laboratoire

Marjory LAFERTE

Techniciens de laboratoire

Sylvia ALIX

Marie BELLEC

Marie-Odile CALVAR

Maité FERRAND

Marc FLABEL

Delphine GEFFARD

Muriel GERVOIS

Hélène GOURDET

Nadine HAPIPI

Laurence HAUDEBERT

Delphine LEROUX

Maryse MADIGOU-CAUDAL

Loïc QUINTON

Stéphanie SOULET-GUERIN

Structures transversales du Pôle de Biologie

- UF 3145 : Plateforme ACPA
- UF 3144 : Plateforme de Génétique Moléculaire des Cancers
- UF 3218 : Plateforme NGS
- UF 3531 : Centre de Ressources Biologiques (CRB)- Santé

Cytogénétique et Biologie cellulaire



Cytogénétique

Biologie
Cellulaire

Constitutionnelle

Acquise (tumeurs)

Postnatal

Prénatal

Hémopathies

Tumeurs
solides





Troubles du cycle



Pathologies endocriniennes



SOPK



Insuffisance ovarienne
prématuée

Troubles mécaniques



Pathologies tubaires



Pathologies utérines



Endométriose

Défauts de production



Pathologies endocriniennes



Origine testiculaire

Défauts de migration



Lésions des voies génitales



ABCD

Insuffisance ovarienne prématuée IOP

- Arrêt de la fonction ovarienne avant 40 ans
- Aménorrhée, \geq FSH
- Non-syndromique ou syndromique
- Infertilité et comorbidités
- Etiologie génétique 25%

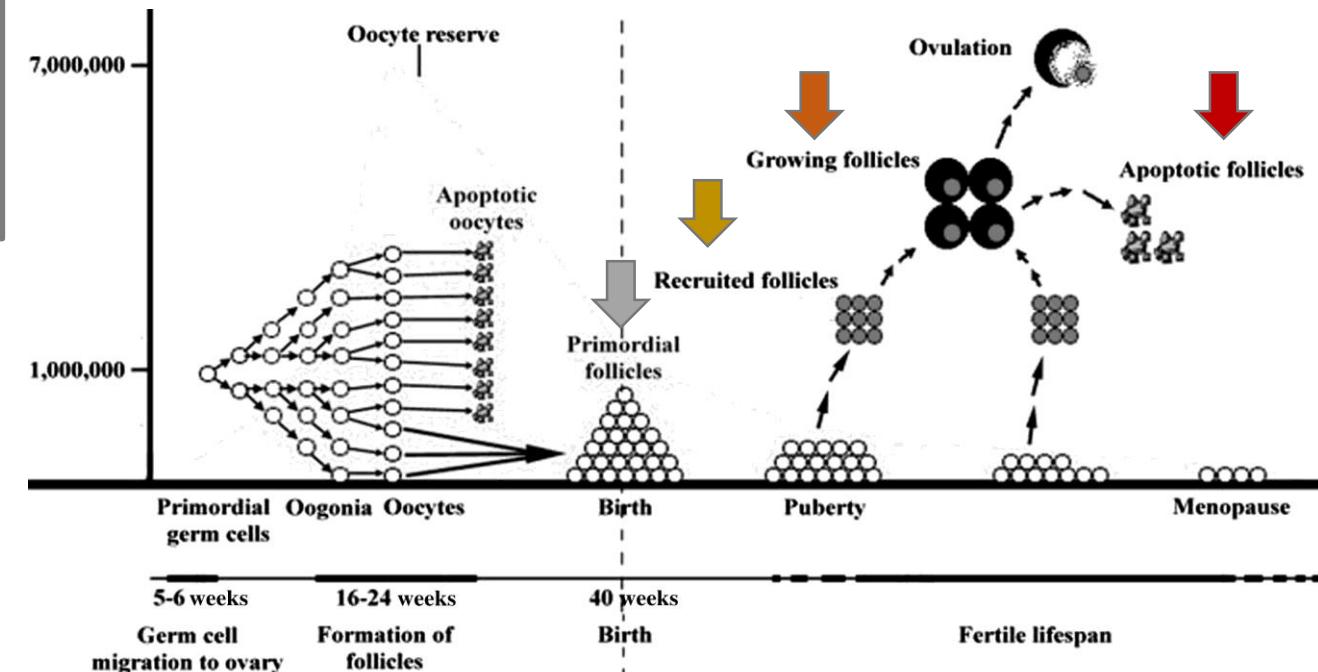


Déplétion du stock de follicules primordiaux

Recrutement folliculaire

Arrêt de la maturation folliculaire

Atrésie folliculaire augmentée



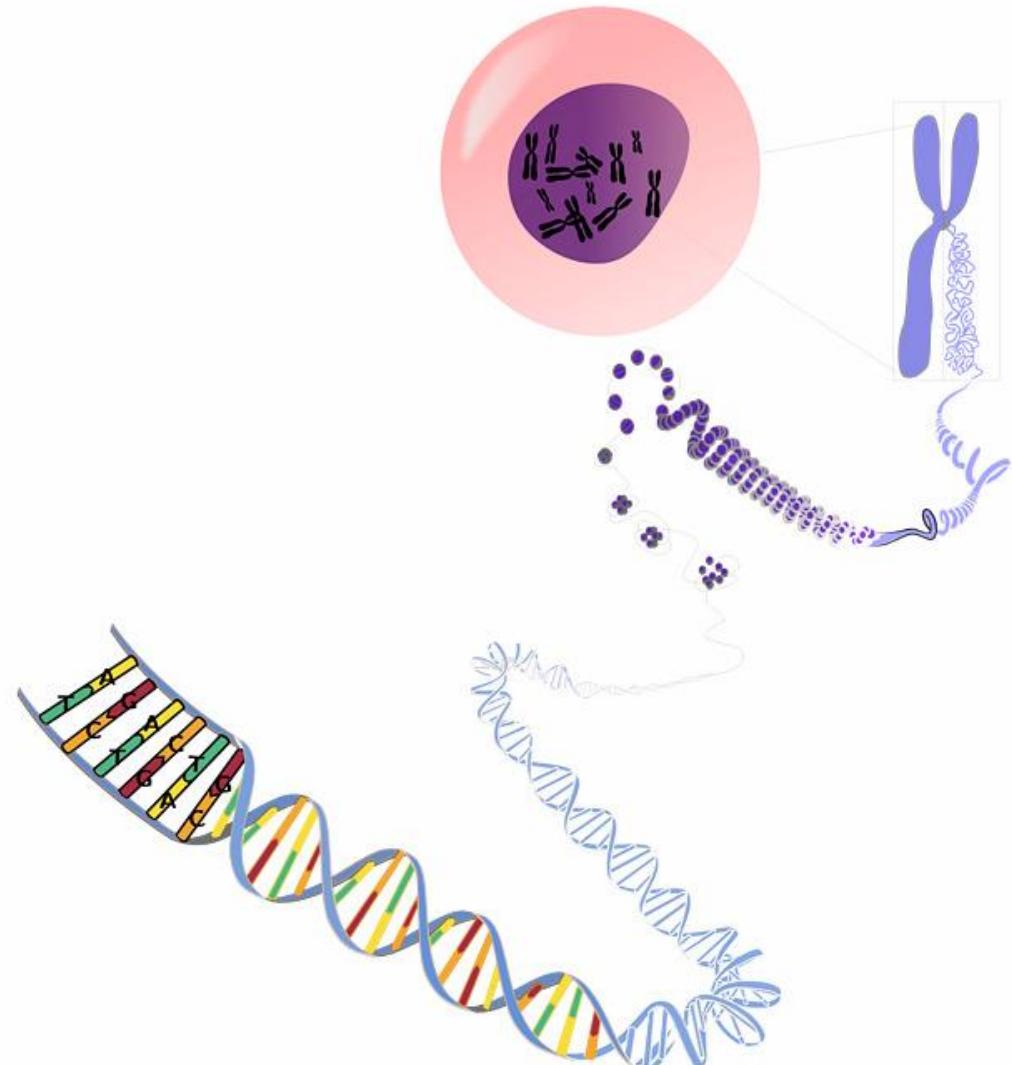
Dixit et al. Reproductive BioMedicine Online. 2010



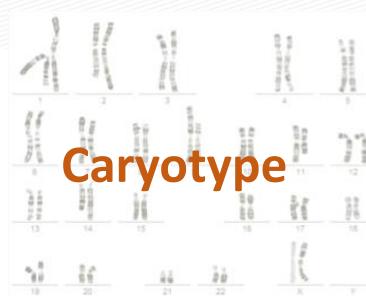
- **1956** : 46 chromosomes chez l'homme
- **1959** : anomalies de nombre → trisomie 21
- **1968** : marquage en bandes
- **1976** : techniques de synchronisation (haute résolution)
- **Années 1980** : Hybridation *in situ* en fluorescence FISH
- **Années 1990** : Hybridation génomique comparative CGH
- **Années 2000** : Séquençage haut débit SHD
- **Années 2010 - 2020** : SHD, une technique unique ?

De la cytogénétique conventionnelle à la cytogénétique moléculaire

Résolution des techniques de cytogénétique



5-10 Mb
150 kb
5 kb
1 pb



Caryotype



FISH



ACPA

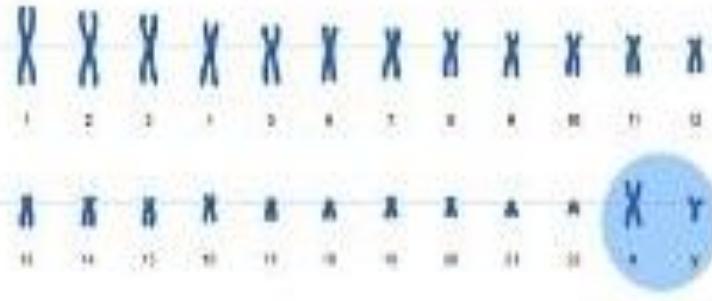


Séquençage

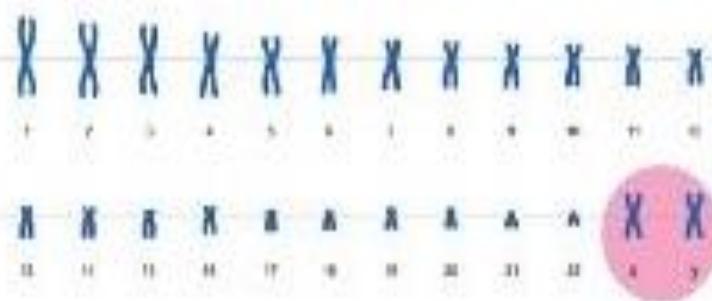




CHROMOSOME



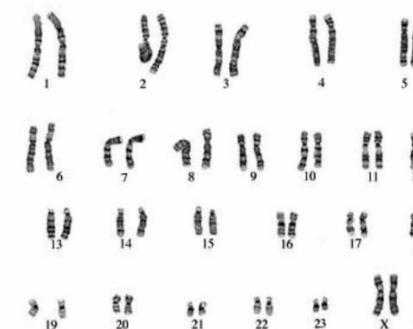
Male



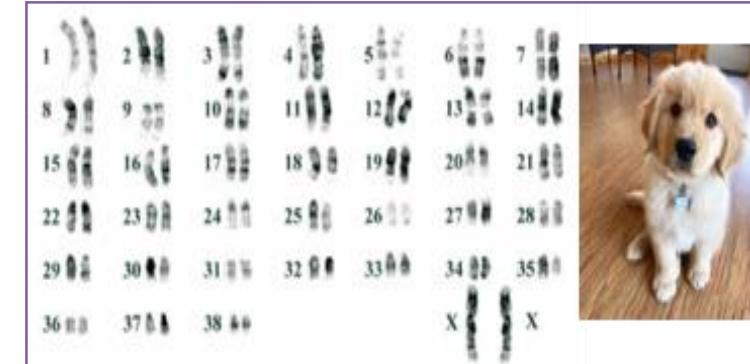
Female



Spécificité de l'espèce humaine : 46 chromosomes



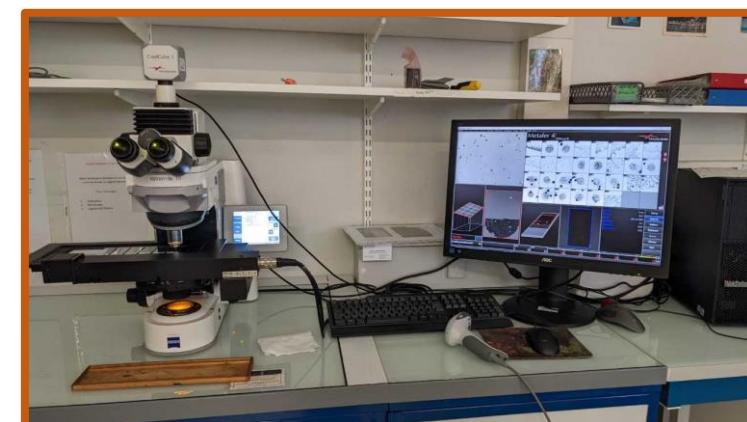
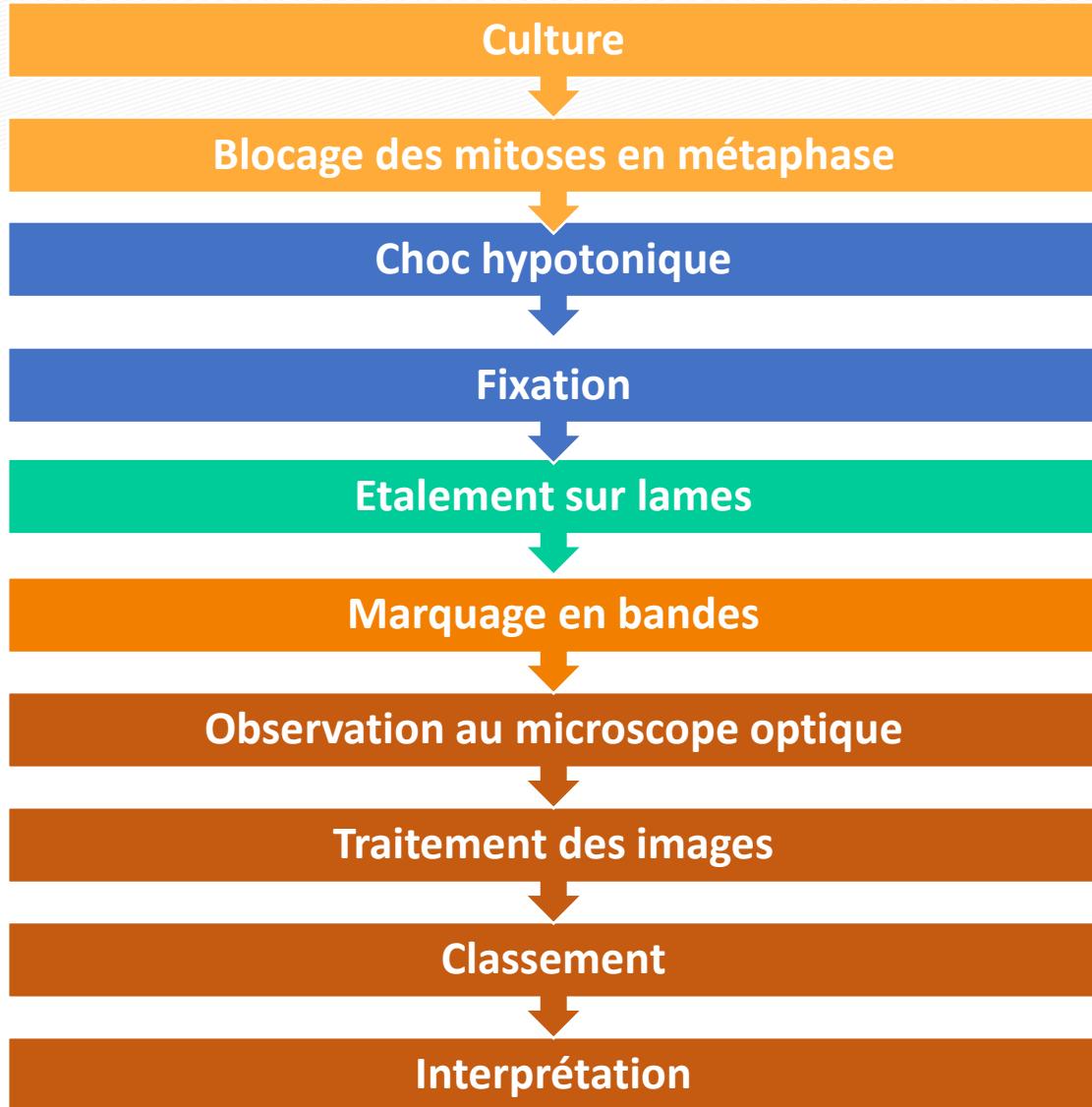
48 chromosomes



78 chromosomes



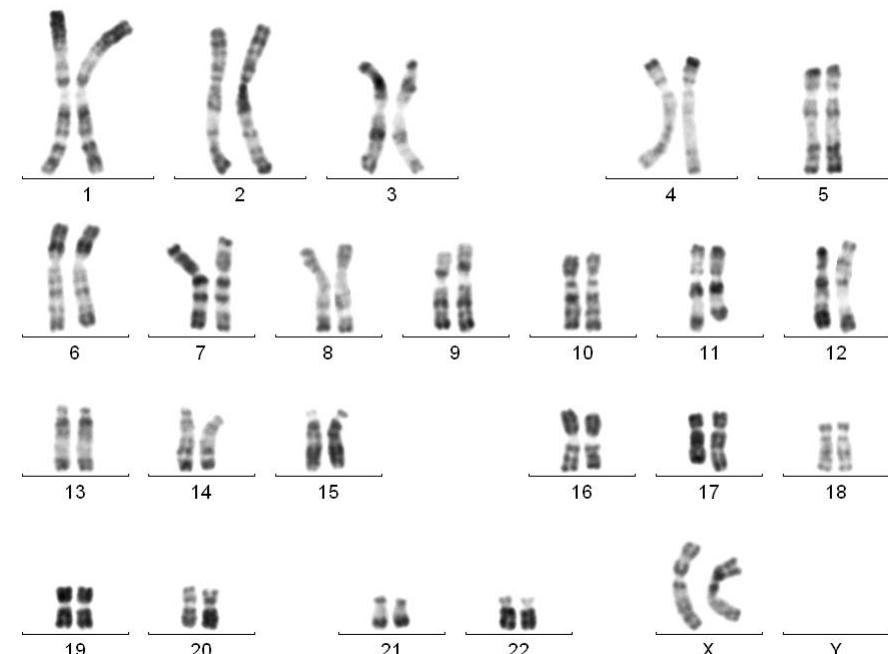
Caryotype





46 chromosomes
22 paires d' autosomes
1 paire de gonosomes : XX ou XY

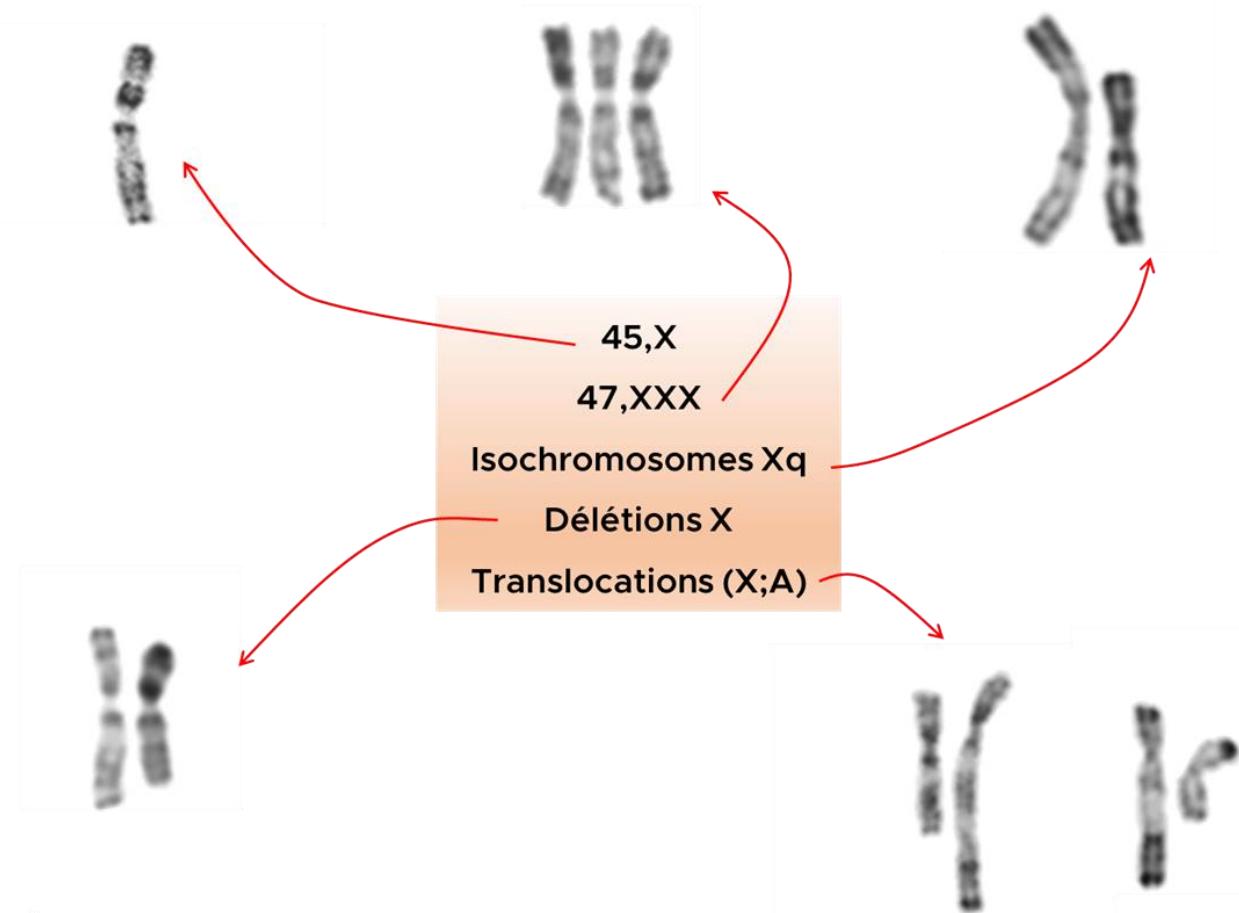
Les chromosomes sont numérotés et rangés par paires par ordre de taille décroissante





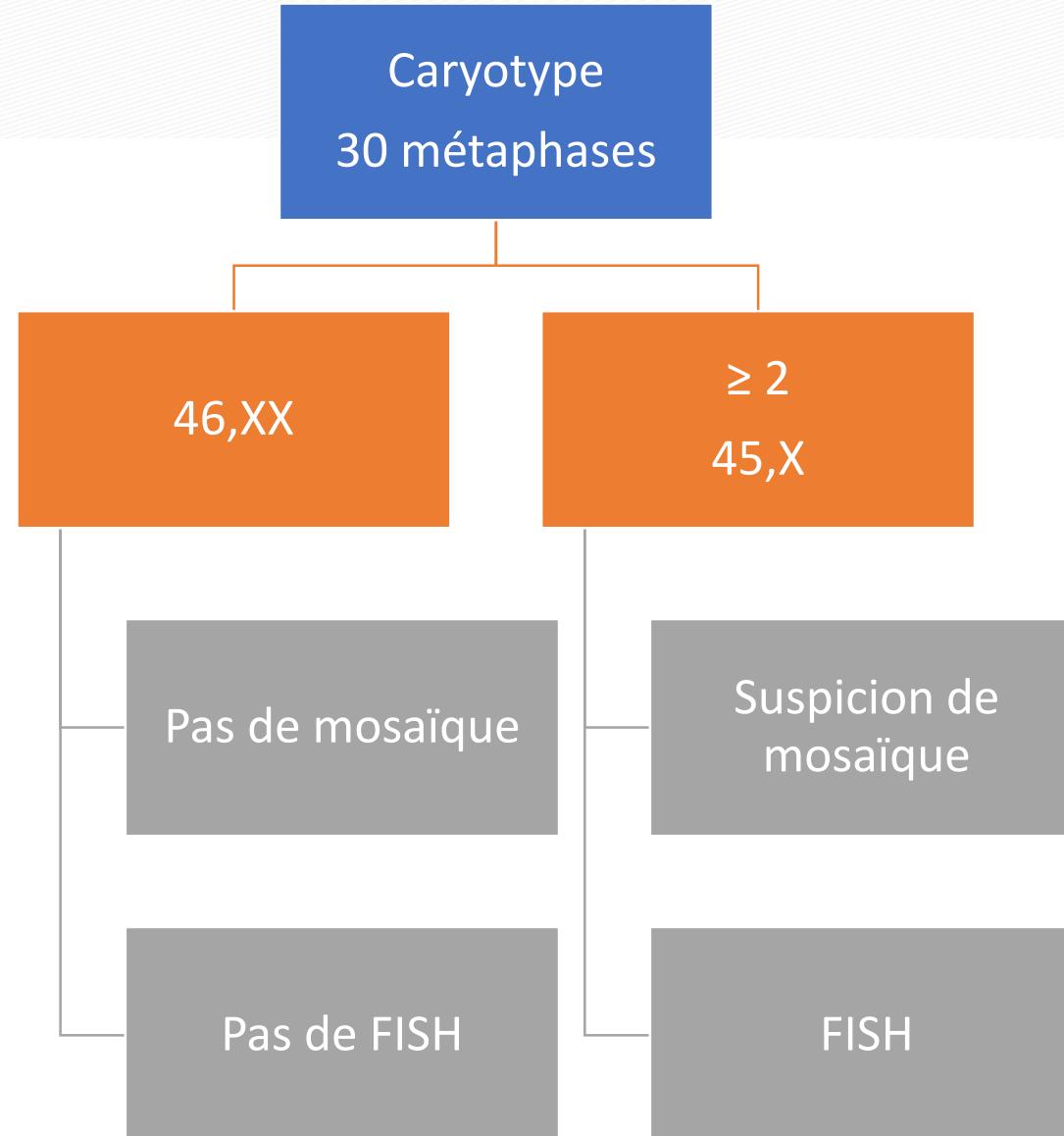
→ IOP : 10 à 13% de remaniements chromosomiques

→ La majorité implique le chromosome X



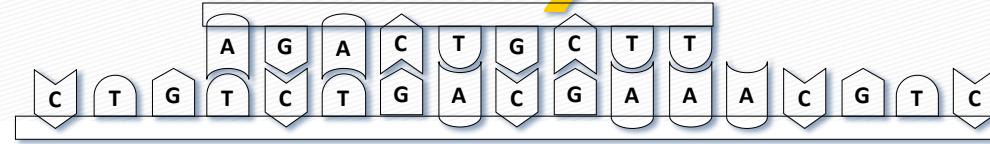


Enquête sur les pratiques des laboratoires de Cytogénétique

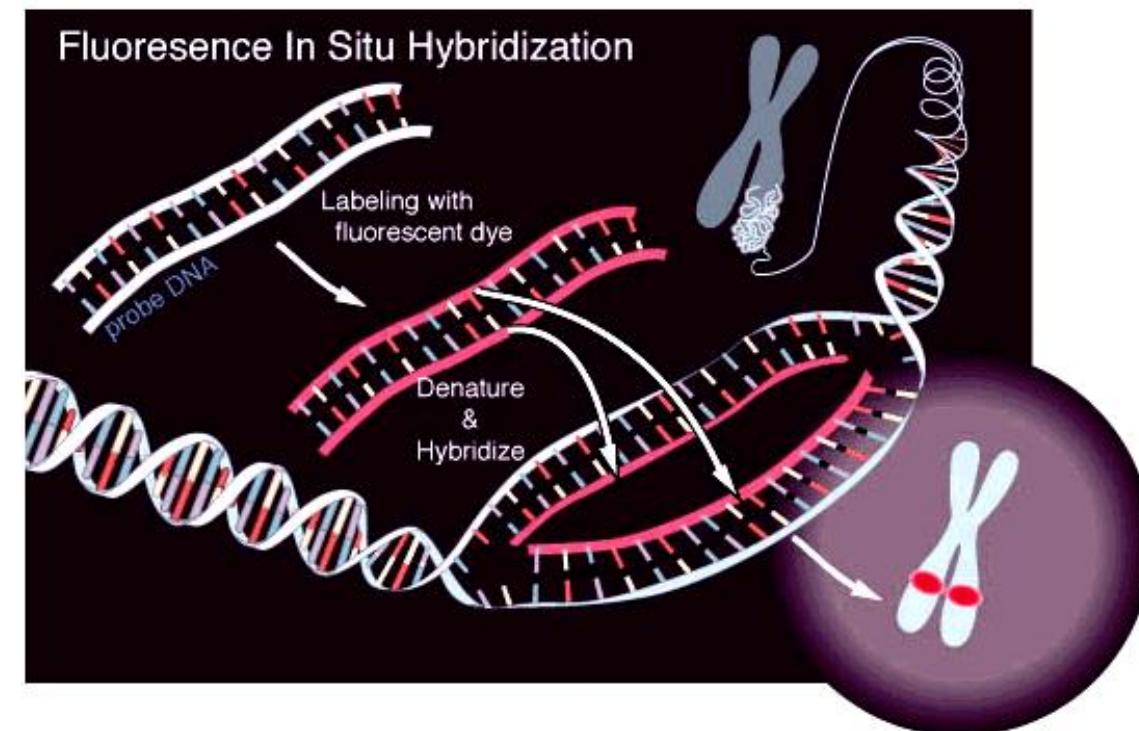
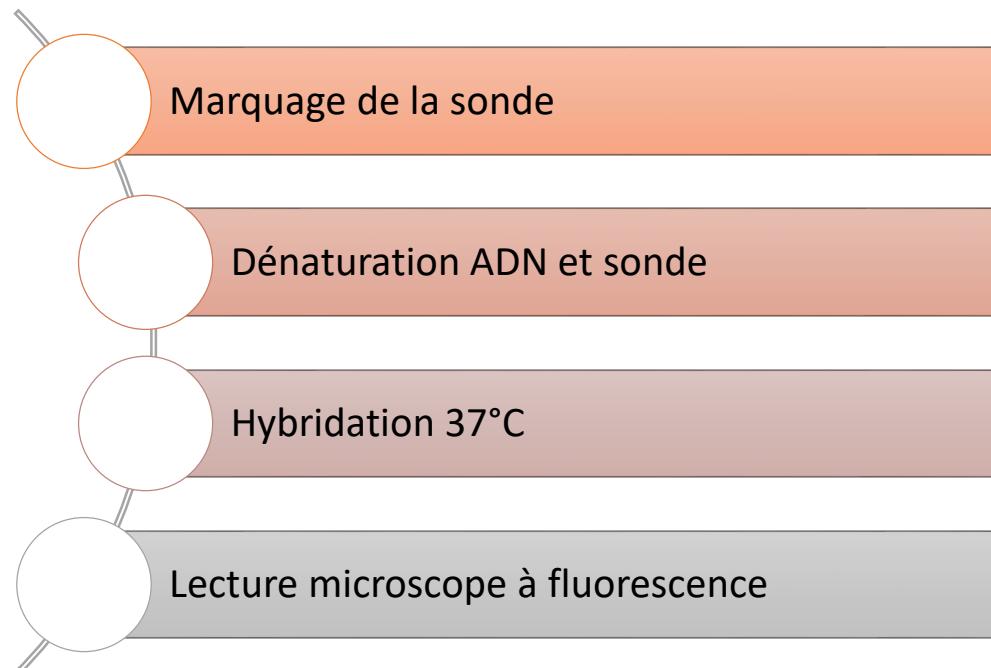


Hybridation *In Situ* Fluorescente (FISH)

Fluorochrome



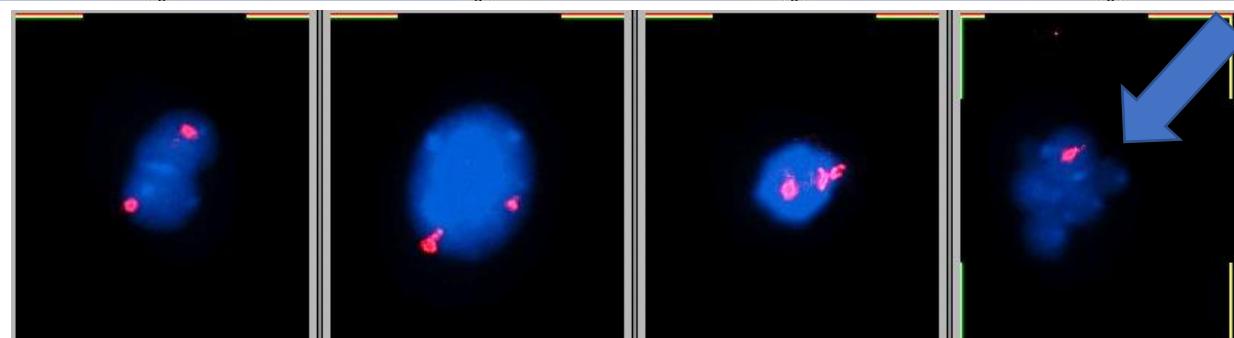
- Propriétés de complémentarité de l'ADN
- Hybridation spécifique d'une séquence d'ADN cible par un fragment d'ADN marqué par un fluorochrome (sonde)



Hybridation *In Situ* Fluorescente (FISH)



200 noyaux
Sonde centromérique de l'X (DXZ1)





Caryotype +/-FISH

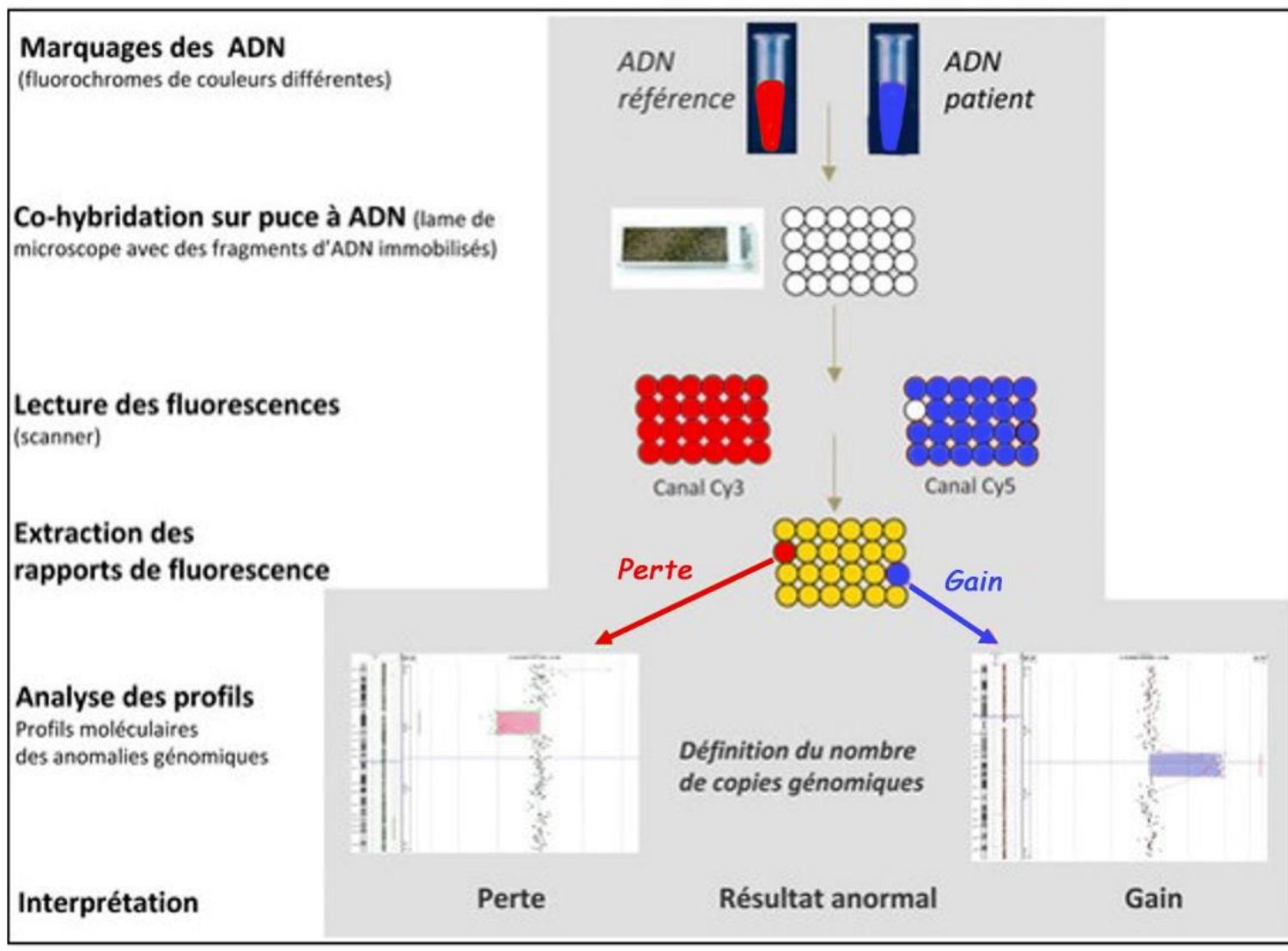
46,XX

Remaniement chromosomique à préciser



ACPA → CNV

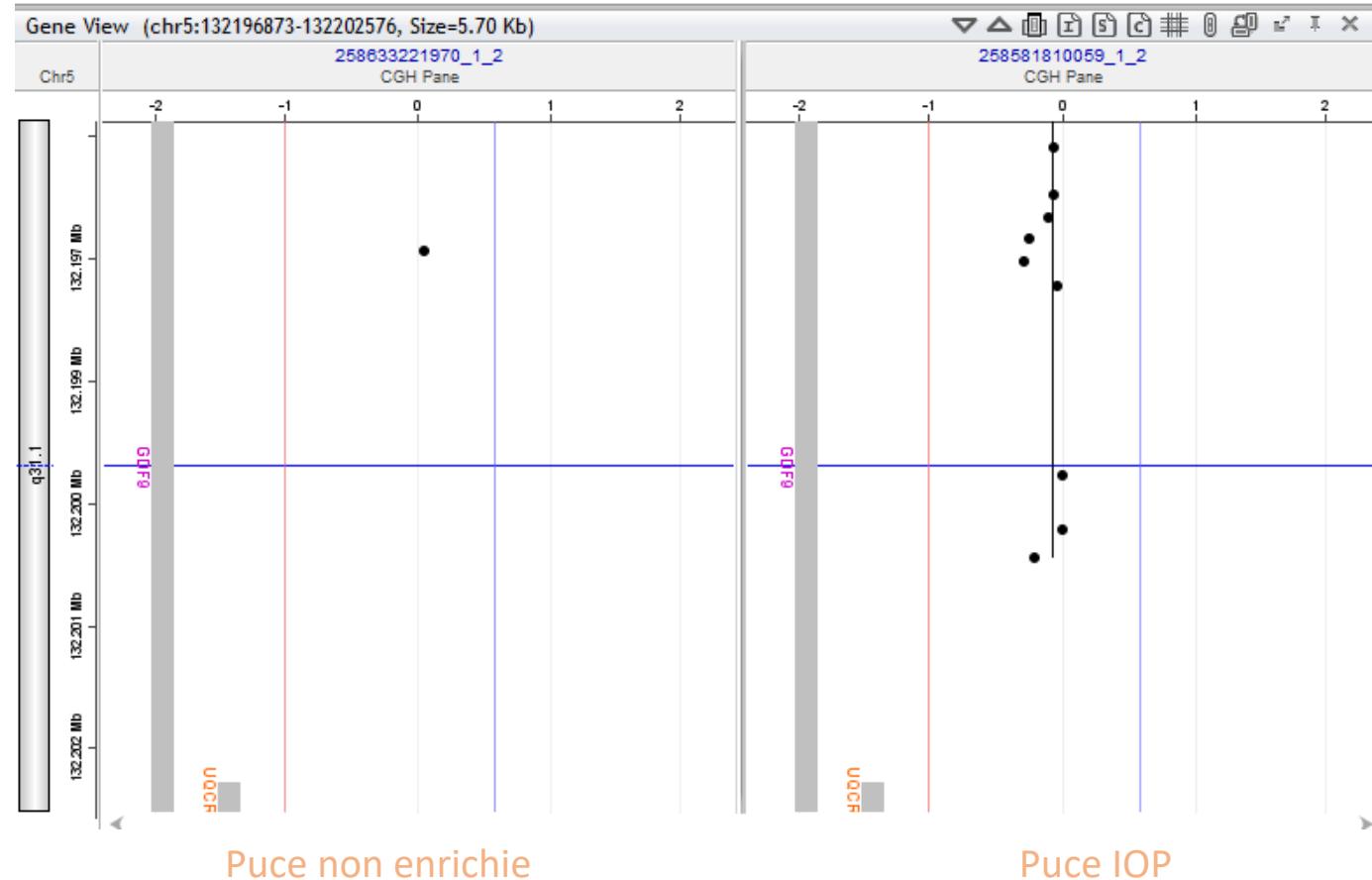
Analyse Chromosomique sur Puce à ADN (ACPA)



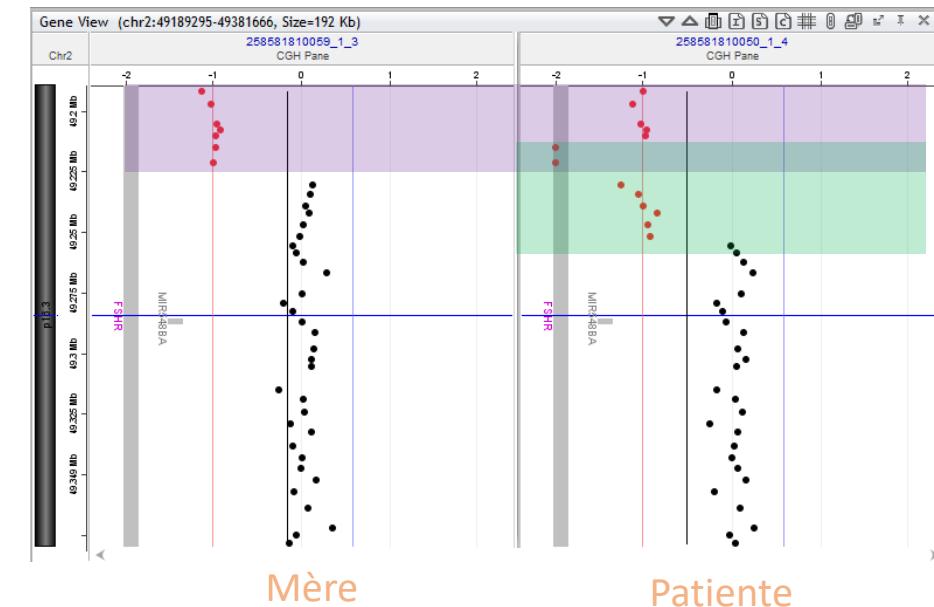
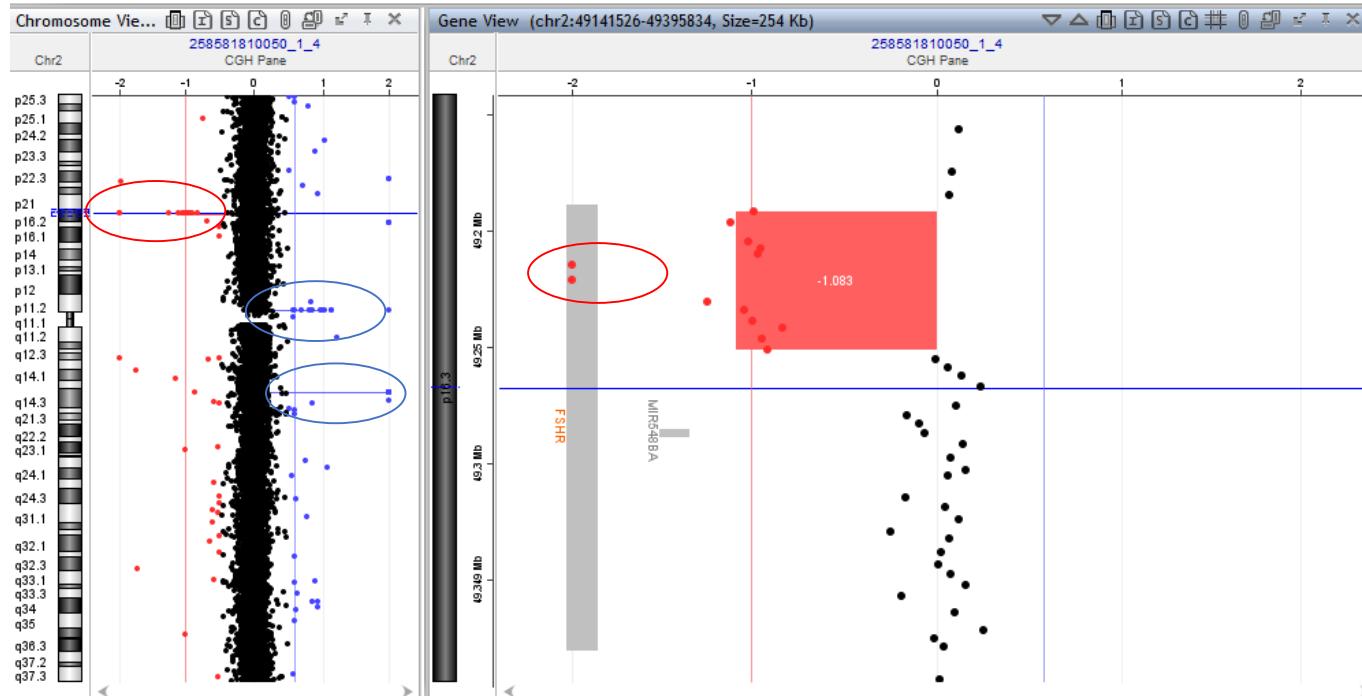


Puce à ADN custom IOP → objectif : enrichir en sondes oligonucléotidiques les régions d'une sélection de gènes impliqués dans l'IOP

130 gènes sélectionnés à partir des données de la littérature



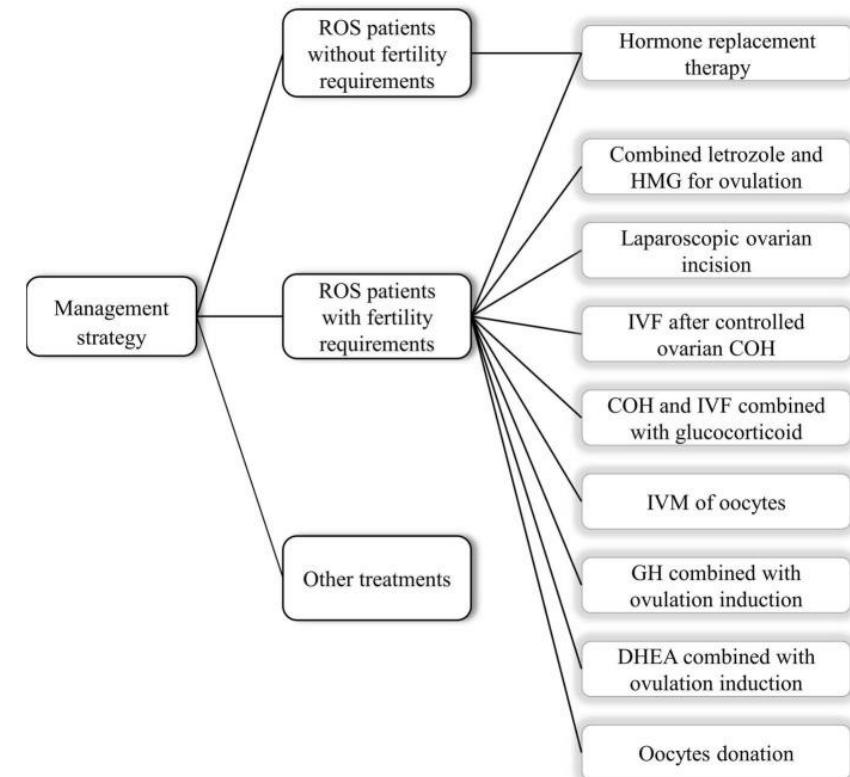
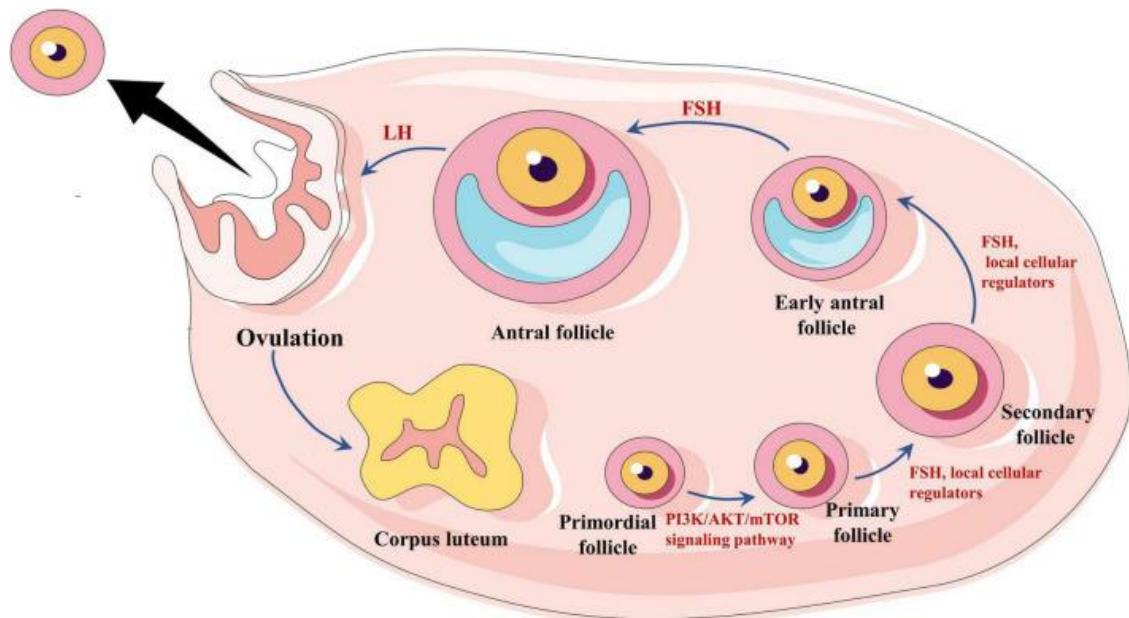
Analyse Chromosomique sur Puce à ADN (ACPA)



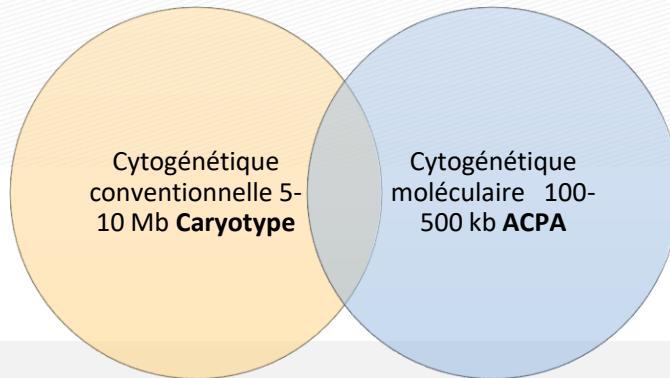
Location	Phenotype	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key	Gene/Locus	Gene/Locus MIM number
2p16.3	Ovarian dysgenesis 1	233300	AR	3	FSHR	136435



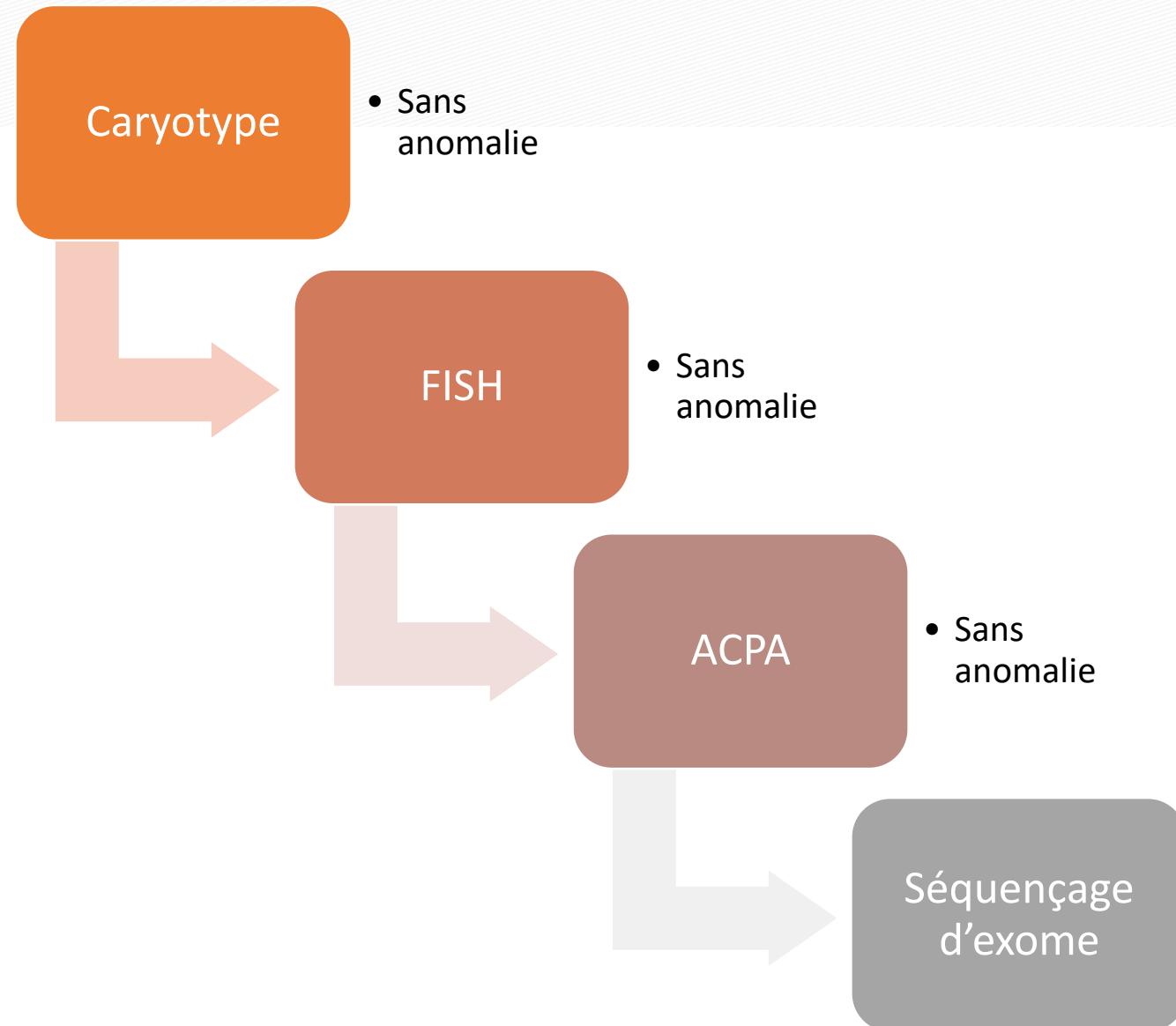
→ **Resistant ovary syndrome (ROS)** : FSH ↑, CFA et AMH normaux



Analyse Chromosomique sur Puce à ADN (ACPA)



Culture cellulaire Approche morphologique		Pas de culture cellulaire Approche quantitative
😊	Pangénomique	😊
😢	Haute résolution	😊
😊	Remaniements équilibrés	😢
😊	Remaniements déséquilibrés	😊
😢	Déséquilibres chromosomiques de « petite taille » CNV	😊
😊	Mosaïques faibles <10-15%	😢

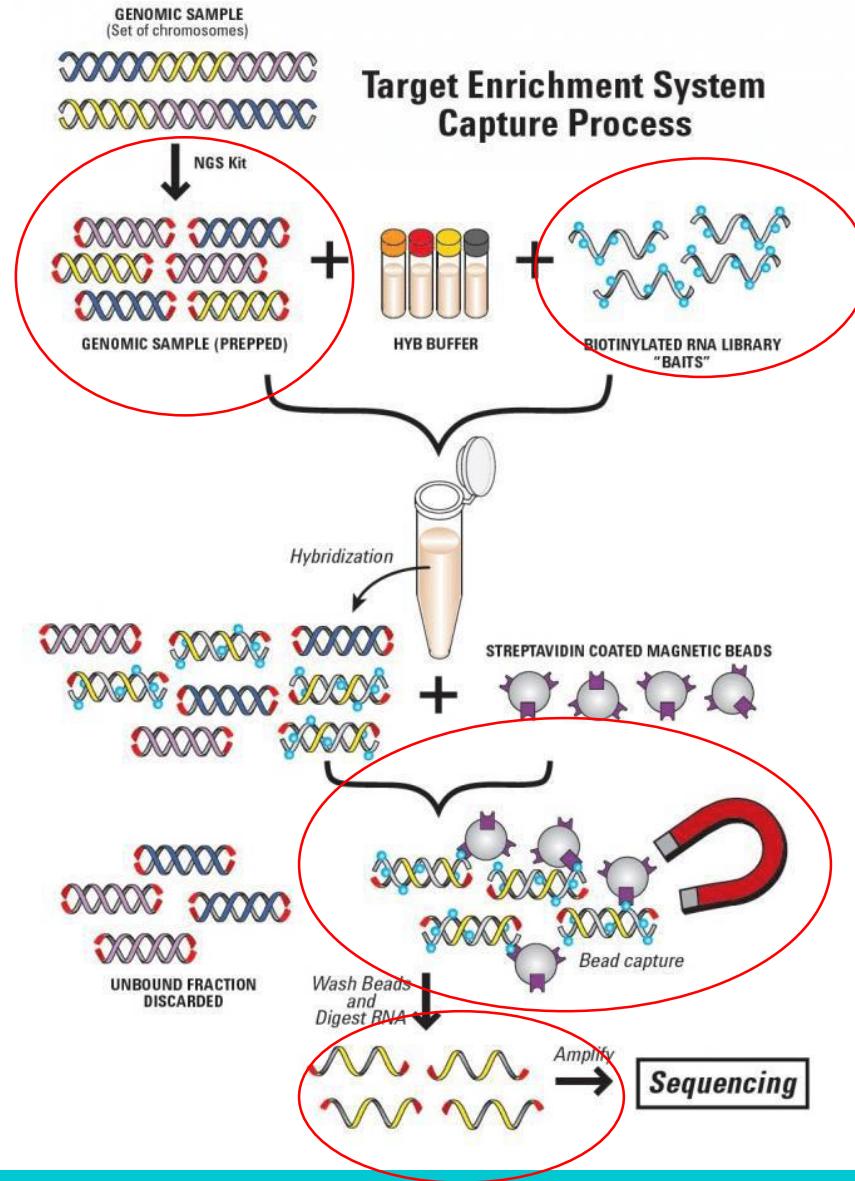




- Analyse de l'ensemble des parties codantes du génome
- 85% des mutations mises en cause dans les maladies génétiques



Séquençage haut débit : exome



Fragmentation de l'ADN

Fixation des adaptateurs et codes-barres

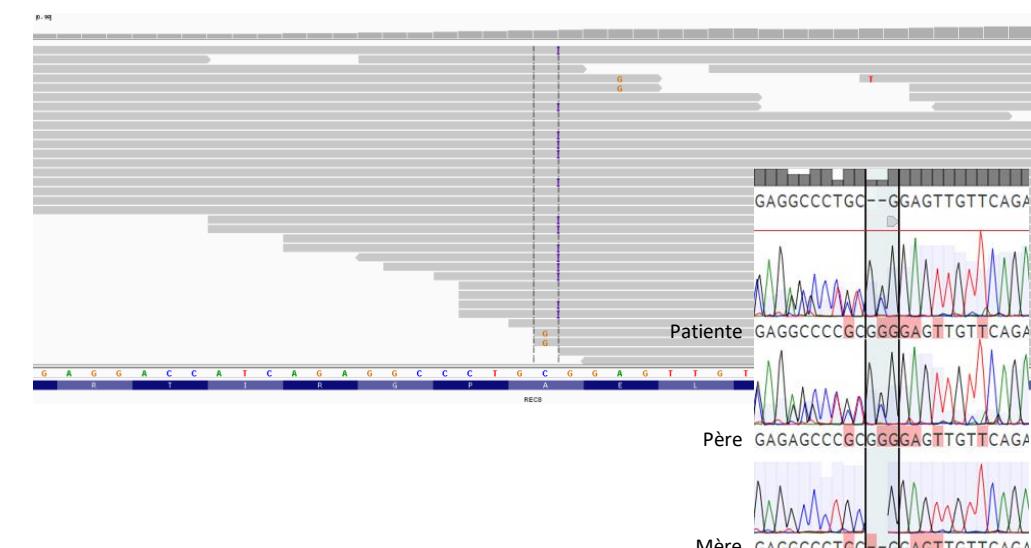
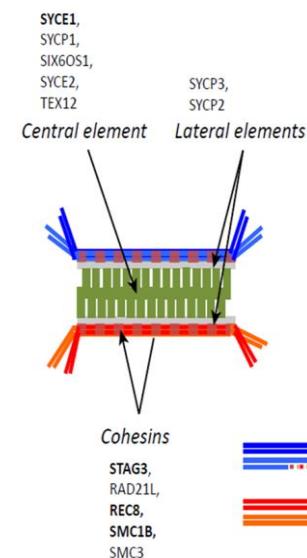
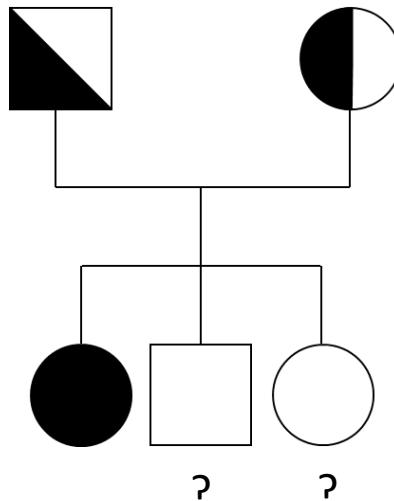
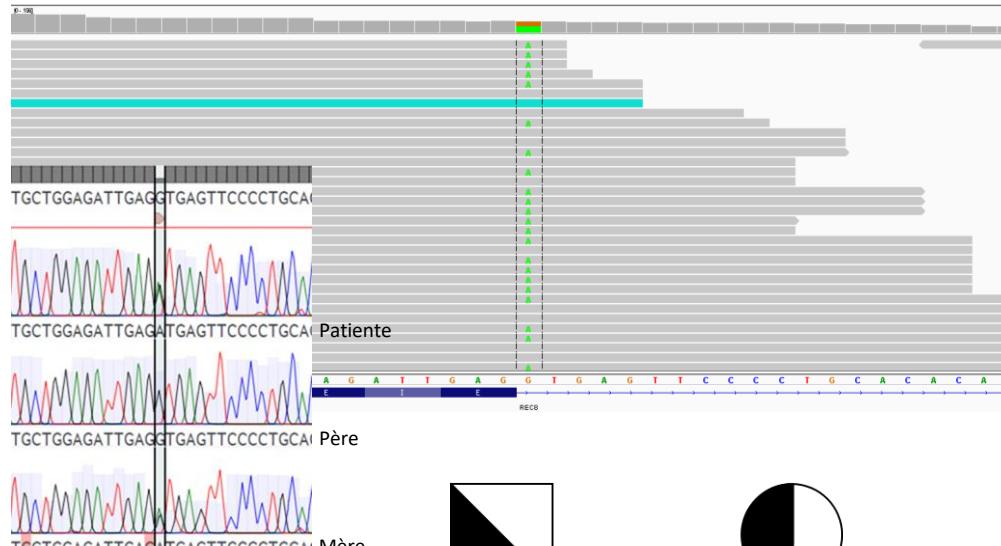
Capture des exons

Amplification

Séquençage

Analyse bio-informatique

Séquençage haut débit : exome

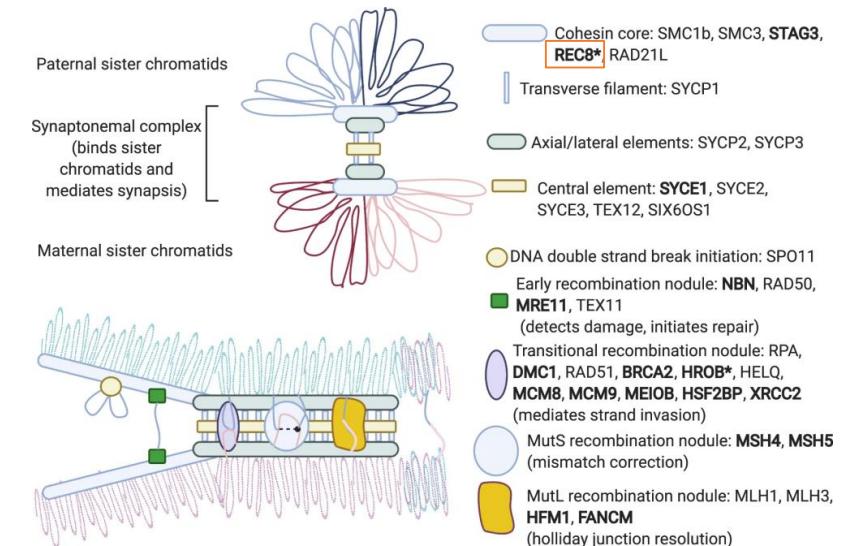
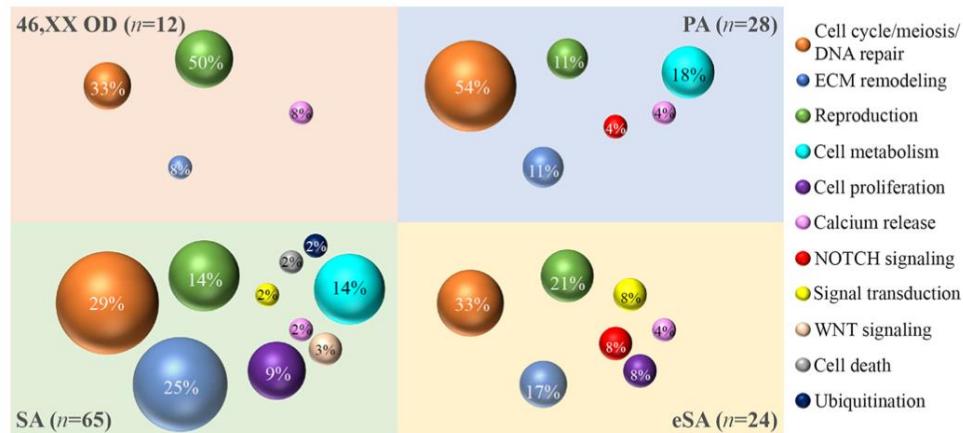


Meiotic genes in premature ovarian insufficiency: variants in *HROB* and *REC8* as likely genetic causes

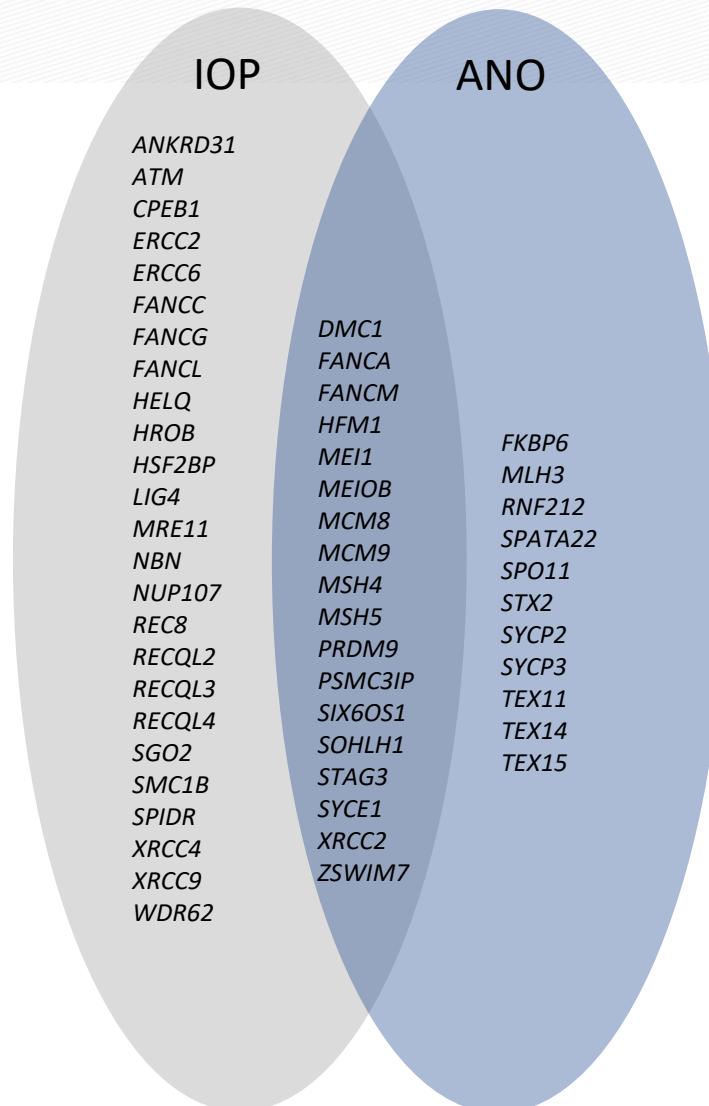
Elena J. Tucker  ^{1,2}✉, Katrina M. Bell¹, Gorjana Robevska¹, Jocelyn van den Bergen¹, Katie L. Ayers^{1,2}, Nurin Listyasari^{1,3}, Sultana MH Faradz³, Jérôme Dulon⁴, Shabnam Bakhshalizadeh^{1,2}, Rajini Sreenivasan^{1,2}, Benedicte Nouyou⁵, Wilfrid Carre⁶, Linda Akloul⁷, Solène Duros⁸, Mathilde Domin-Bernhard⁸, Marc-Antoine Belaud-Rotureau^{5,9}, Philippe Touraine^{4,10}, Sylvie Jaillard  ^{5,9,10}✉ and Andrew H. Sinclair^{1,2,10}



- **REC8** : composant du complexe cohésine spécifique de la méiose
- Liaison des chromatides sœurs
- Indispensable au bon déroulement de la méiose
- Infertilité masculine ?



Tucker et al. Eur J Hum Genet. 2021; Rosetti et al. Front Endocrinol (Lausanne). 2021



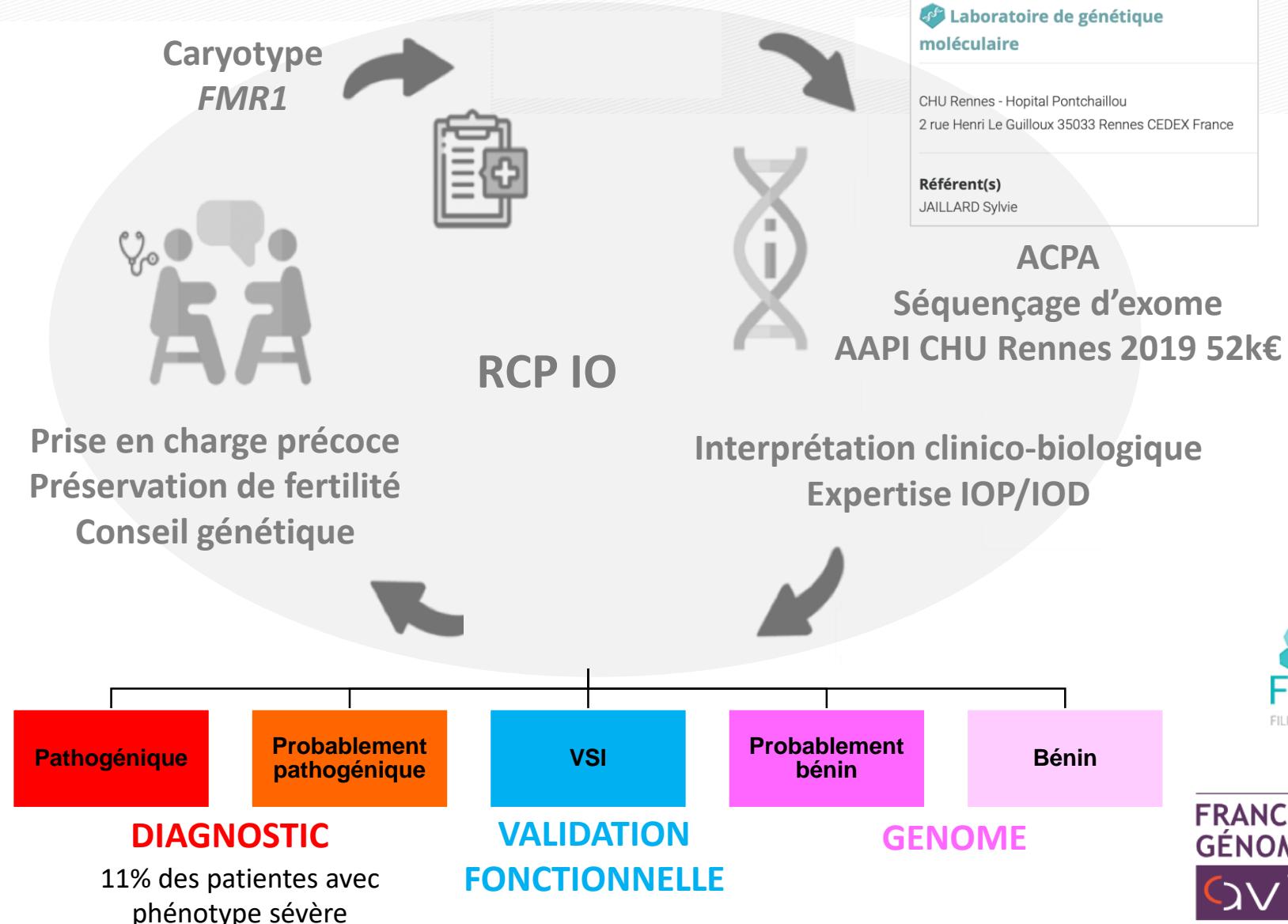
2021



**Shared genetics between
nonobstructive azoospermia and
primary ovarian insufficiency**

Lauren Verrilli, M.D.,^a Erica Johnstone, M.D., M.H.S.,^a Kristina Allen-Brady, Ph.D., M.S.P.H, M.P.T.,^b
and Corrine Welt, M.D.^c

Séquençage haut débit : exome





- Complexité génétique
- Prise en charge optimisée : don d'ovocytes, préservation de la fertilité, conseil génétique
- Nouvelles stratégies diagnostiques : évolution et complémentarité des techniques
- Evolution des compétences techniques : habilitation, accréditation
- Nouvelles perspectives thérapeutiques : édition du génome



Merci pour votre attention

