

Architecture génétique de l'insuffisance ovarienne primitive : Nouveaux liens avec les Gènes de Méiose/Réparation de l'ADN, nouvelles voies moléculaires identifiées et implication pour une Médecine Personnalisée

Abdelkader Heddar

▶ **To cite this version:**

Abdelkader Heddar. Architecture génétique de l'insuffisance ovarienne primitive : Nouveaux liens avec les Gènes de Méiose/Réparation de l'ADN, nouvelles voies moléculaires identifiées et implication pour une Médecine Personnalisée. Endocrinologie et métabolisme. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASL084 . tel-04520750

HAL Id: tel-04520750
https://theses.hal.science/tel-04520750

Submitted on 25 Mar 2024

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.

THESE DE DOCTORAT

NNT : 2022UPASL084

Architecture génétique de l'insuffisance ovarienne primitive : Nouveaux liens avec les Gènes de Méiose/Réparation de l'ADN, nouvelles voies moléculaires identifiées et implication pour une Médecine Personnalisée

Genetic Landscape of Primary Ovarian Insufficiency: New Links to Meiosis/DNA Repair Genes, New Molecular Pathways Identified and Implications for Personalized Medicine

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay
École doctorale n°582 : cancérologie : biologie - médecine - santé (CBMS)
Spécialité de doctorat : Biochimie et Biologie Moléculaire
Référent : Faculté de médecine

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Physiopathogenèse et traitement des maladies du foie** (Université Paris-Saclay, Inserm) sous la direction de **Micheline MISRAHI**, Professeure des universités-Praticienne Hospitalière

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 14 décembre 2022 par

Abdelkader HEDDAR

Composition du Jury

Marc HUMBERT PU-PH, Université Paris Saclay	Président
Odile COHEN- HAGUENAUER MCU-PH, Université Paris cité	Rapporteure & Examinatrice
Célia RAVEL PU-PH, Université Rennes1	Rapporteure & Examinatrice
Samir HAMAMAH PU-PH, Université de Montpellier	Examinateur
Claude HOUDAYER PU-PH, Université de Rouen	Examinateur
Nathalie MASSIN PH, CHI de Créteil	Examinatrice
Reiner A VEITIA PU,Université Paris Saclay/Paris Cité	Examinateur

université PARIS-SACLAY | ÉCOLE DOCTORALE Cancérologie : biologie - médecine - santé (CBMS)

Titre : Architecture génétique de l'insuffisance ovarienne primitive : Nouveaux liens avec les Gènes de Méiose/Réparation de l'ADN, nouvelles voies moléculaires identifiées et implication pour une Médecine Personnalisée.

Mots clés : insuffisance ovarienne primaire ; séquençage de l'exome entier ; médecine personnalisée; NF-κB; Immunité; Régulation post-traductionnelle.

Résumé : L'insuffisance ovarienne primitive (IOP), problème de santé publique, atteint 1-3,7% des femmes avant 40 ans. Elle est responsable d'infertilité et de diminution de longévité. Nous avons pour la première fois impliqué BRCA2, gène majeur de prédisposition aux cancers du sein et de l'ovaire, dans une IOP isolée confirmant le lien génétique entre infertilité et cancer. Nous avons développé un diagnostic génétique de haute performance dans 29.3% des cas d'une cohorte sans précédent de 375 IOP.

Neuf nouveaux gènes sont impliqués dans la réparation d'ADN, ou dans de nouvelles voies : l'inflammation, la transcription/traduction et la mitophagie, et correspondent à de potentielles futures cibles thérapeutiques. La génétique permet une médecine personnalisée pour i) prévenir/guérir les comorbidités pour les gènes de susceptibilité aux tumeurs/cancers, ou pour les IOP syndromiques génétiquement révélés ii) prédire une réserve ovarienne résiduelle et donc un pronostic de fertilité

Title : Genetic Landscape of Primary Ovarian Insufficiency: New Links to Meiosis/DNA Repair Genes, New Molecular Pathways Identified and Implications for Personalized Medicine.

Keywords : Primary Ovarian Insufficiency, exome sequencing, personnalized medicine, NF-kB, Immunity, post-translational regulation

Abstract Primary ovarian insufficiency (POI), a public health problem, affects 1-3.7% of women before the age of 40. It is responsible for infertility and reduced longevity. For the first time, we implicated BRCA2, a major predisposition gene for breast and ovarian cancer, in an isolated POI confirming the genetic link between infertility and cancer. We have developed high-performance genetic diagnosis in 29.3% of cases from an unprecedented cohort of 375 pateints.

Nine new genes are involved in DNA repair, or in new pathways: inflammation, transcription/translation and mitophagy, and correspond to potential future therapeutic targets. Genetics enables personalized medicine to i) prevent/cure comorbidities for tumor/cancer susceptibility genes, or for genetically revealed syndromic POI ii) predict residual ovarian reserve and hence fertility prognosis.

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Didier Samuel, Doyen de la faculté de médecine Paris Saclay pour m'avoir accueilli dans la faculté de médecine Paris Saclay et dans votre unité de recherche, pour votre disponibilité depuis mon arrivée dans cette faculté, pour votre confiance et pour vos conseils.

A Madame le Professeure Micheline Misrahi, pour m'avoir encadré durant ce travail de thèse**.** Merci de m'avoir transmis ta passion pour la génétique des infertilités, et peut être j'espère, au moins en partie, ta rigueur scientifique.

A Monsieur le Professeur Marc Humbert, qui me fait l'honneur de présider la soutenance de cette thèse. Votre excellence scientifique est un modèle. Veuillez trouver ici l'expression de ma grande considération et de tout mon respect.

A Madame le Docteur Odile Cohen-Haguenauer, merci d'avoir accepté d'être rapporteure de ce travail de thèse. Vos très grandes compétences sont indispensables dans ce domaine d'interface entre infertilité et cancer.

A Madame le Professeur Célia Ravel, merci d'avoir accepté d'être rapporteure de cette thèse et veuillez recevoir ici ma plus grande gratitude.

A Monsieur le Professeur Samir Hamamah. Je suis vraiment très honoré que vous ayez accepté d'être dans ce jury connaissant votre investissement dans le Plan Fertilité**.**

A Monsieur le Professeur Claude Houdayer. Merci d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je n'ai pas eu la chance de travailler directement avec vous mais votre renommée dans le domaine de la génétique est un exemple à suivre.

A Madame le Professeur Nathalie Massin. Merci d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Votre investissement dans ce thème rend votre présence nécessaire.

A Madame le Professeur Florence Boitrelle. Je vous remercie infiniment pour vous êtes rendue disponible pour la soutenance pour mon travail de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Reiner A Veitia. Merci d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Les échanges avec toi sur la génétique de l'IOP étaient très enrichissantes. Ta rigueur scientifique a été un modèle.

Merci à toutes les patientes et membres des familles étudiées, **aux cliniciens** qui nous ont fait confiance et aux **collaborateurs** qui ont permis l'aboutissement de ce travail.

TABLE DES MATIERES

1 ABREVIATION.....7

2 INTRODUCTION..... 11

2.1.Ovaire et réserve ovarienne……..... 14

2.2.La folliculogénèse……16

2.3.Définition…….. 19

2.4.Physiopathologie de l'IOP…….. 19

2.5.Epidémiologie de l'IOP…… 20

2.6.Complications associées à l'IOP…….. 20

2.6.1 Maladies cardiovasculaires……..….21

2.6.2 Diabète et syndrome métabolique…….…..22

2.6.3 Dyslipidémie……..…..23

2.6.4 Ostéoporose…….....23

2.6.5 Déclin cognitif, risque de démence et dépression…….24

2.6.6 Lien entre IOP, ménopause et espérance de vie……..24

2.7.Etiologies……..29

2.7.1 Étiologies auto-immunes…….29

2.7.2 Étiologies infectieuses…….29

2.7.3 Étiologies toxiques……30

2.7.4 Étiologies iatrogènes……30

2.7.5 Etiologies chromosomiques……31

2.7.6 Etiologies monogéniques……32

3 PRESENTATION DES TRAVAUX..... 60

3.1. ARTICLE 1 :Implication de la voie de réparation de l'ADN de Fanconi dans l'IOP…….60

3.2. ARTICLE 2 : A Novel Phenotype Combining Primary Ovarian Insufficiency Growth

Retardation and Pilomatricomas With MCM8 Mutation…….. 91

3.3.ARTICLE 3 : Novel STAG3 mutations in a Caucasian family with primary ovarian insufficiency……111

3.4. ARTICLE 4 :A SPIDR homozygous nonsense pathogenic variant in isolated primary ovarian insufficiency with chromosomal instability……125

3.5. ARTICLE 5 : Genetic landscape of a large cohort of Primary Ovarian Insufficiency: New genes and pathways and implications for personalized medicine……134

3.6.ARTICLE 6-8 :Pièges d'interprétation dans la génétique de l'insuffisance Ovarienne primitive …… 184

4 SYNTHESE ET DISCUSSION GENERALE 204

5 CONCLUSIONS ET PERSPECTVES 227

6 REFERENCES 229

7 ANNEXES 283

7.1. REVUE 1 : Advances in the Molecular Pathophysiology, Genetics, and Treatment of Primary Ovarian Insufficiency.....283

1 ABREVIATION

ACMG : American College of Medical Genetic
AF : Anémie de Fanconi
AIRE : *AutoImmune REgulator*
AMH : Anti-Mullerian Hormone
APECED: *Autoimmune Polyendocriniopathy-Candidosis-EctodermalL Dystroph*y
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated Serine/Threonine Kinase

BER : Base Excision Repair
BLM : Bloom Syndrome RecQ Like Helicase
BNC1 : Basonuclin 1
BMP15 : Bone Morphogenetic Protein 15
BMPR1B : Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1B
BPES : blépharophimosis-ptosis-épicanthus inversus
BRCA2 (FANCD1) : Breast Cancer Type 2 Susceptibility Protein (Fanconi Anemia Group D1).

CLPP : Caseinolytic Mitochondrial Matrix Peptidase Proteolytic Subunit
CMMR-D : Constitutional Mismatch Repair. Deficiency.
CENPE : Centromere Protein E

DS : déviation standard
DSB : Double-Strand breaks

ERAL1 : Era Like 12S Mitochondrial RRNA Chaperone 1
EBV : Ebstein-barr virus
EPCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule
ERCC6 : Excision Repair Cross-Complementation Group 6

FANCB : Fanconi Anemia Group B
FANCM : Fanconi Anemia Group M
FANCU (XRCC2) : Fanconi Anemia Group R
FIGLA : Factor In The Germline Alpha
FIV: Fécondation in vitro
FMR1 : Fragile X mental retardation
FOXL2 : Forkhead Box L2
FOXO3 : Forkhead Box O3
FP : Follicule primordial
FSH : Follicule Stimulating Hormone

FSHR : Follicle Stimulating Hormone Receptor
FXTAS :Fragile X Tremor Ataxia Syndrome

GALT : Galactose-1-Phosphate Uridylyltransferase
GDF9 : Growth Differentiation Factor 9
GFP : Green Fluorescent Protein
GGPS1 : Geranylgeranyl Diphosphate Synthase 1
GH : Growth hormone
GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone
GWAS : Génome Wide Association Study

HARS2 : Histidyl-TRNA Synthetase 2, Mitochondrial
HELQ : Helicase, POLQ Like
HR : Hazard ratio
HROB : Homologous Recombination Factor With OB-Fold
HSD17B4 : Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase 4
HTAP : Hypertension Artérielle pulmonaire

ICSI : Intracytoplasmic sperm injection
IMC : Indice de masse corporelle
IOP : Insuffisance ovarienne primitive
IVA : In Vitro follicular Activation

LARS2 : Leucyl-TRNA Synthetase 2, Mitochondrial
LH : Luteizing Hormone
LHX8 : LIM Homeobox 8

MCM : Mini chromosome Maintenance
MLH1: MutL Homolog 1
MMC : mitomycine
MMR : Mismatch Repair
MSH2: MutS Homolog 2
MSH4 : MutS Homolog 4
MSH5 : MutS Homolog 5
MSH6: MutS Homolog 6

NER : Nucleotide Excision Repair
NGS : Next Generation Sequencing
NHEJ : Non-Homologous End-Joining

NIPBL : Nipped-B-Like Protein
NMD : Nom-Mediated mRNA Decay
NOBOX : Newborn Ovary Homeobox-Encoding Gene
NR5A1 : Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 1

OR : Odds ratio

PCCA : Propionyl-CoA Carboxylase Subunit Alpha
PCCB : Propionyl-CoA Carboxylase Subunit Beta
PI3K/AKT : phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)
PMM2 : Phosphomannomutase 2
PMS2: Postmeiotic Segregation Increased 2
POF1/2 : Premature Ovarian Failure 1/2
PRORP: Protein Only RNase P Catalytic Subunit
PSMC3IP : Proteasome 26S ATPase Subunit 3-Interacting Protein
PTEN : Phosphatase And Tensin Homolog

RAD21L : RAD21 Cohesin Complex Component Like 1
RAD51 (FANCR) : RAD51 Recombinase (Fanconi Anemia Group R)
RCBTB1 : Regulator Of Chromosome Condensation And BTB Domain Containing Protein 1
RCIU : Retard de croissance intra utérin
REC8 : Recombination And Sister Chromatid Cohesion Protein Homolog
RMND1 : Required For Meiotic Nuclear Division 1 Homolog
RMI1/2 : RecQ Mediated Genome Instability 1 / 2
RR : Relative risk ou Risque relatif
RSPO1 : R-Spondin 1

SMAD4 : Mothers against decapentaplegic homologue 4
SMC1α : Structural Maintenance Of Chromosomes 1A
SMC1β : Structural Maintenance Of Chromosomes 1B
SMC3 : Structural Maintenance Of Chromosomes 3
SOHLH1et 2 : Spermatogenesis And Oogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix 1/2
SOX9 : SRY-Box Transcription Factor 9
SPIDR : Scaffold Protein Involved In DNA Repair
STAG3 : Stromal Antigen 3
STK11 : Serine/Threonine Kinase 11
SWI5 : SWItch5 Homologous Recombination Repair Protein

TGFβ : The transforming growth factor beta

TOP3A : DNA Topoisomerase III Alpha
TSC1 /2 : Tuberous Sclerosis Protein 1/2
TWNK: Twinkle MtDNA Helicase

WNT4 : Wnt Family Member 4
WT1 : Wilms Tumor 1

2 INTRODUCTION

L'infertilité se définit par l'incapacité pour un couple d'obtenir une grossesse clinique après 12 mois de rapports sexuels non protégés (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009, 2017). Elle peut concerner un couple sur 7 voire un couple sur quatre. On estime que l'infertilité touche entre 8 à 15 % des couples en âge de procréer dans le monde mais peut atteindre jusqu'à 30% dans certaines ethnies notamment en Afrique subsaharienne et au moyen orient (Mascarenhas *et al.*, 2012; Ray *et al.*, 2012; Vander Borght and Wyns, 2018). L'infertilité peut être d'origine masculine, féminine ou mixte (Vander Borght and Wyns, 2018). En France, plus de 3 millions de personne sont touchés par ce problème d'infertilité (Pr Samir Hamamah, Plan fertilité 2022). Il s'agit donc d'un enjeu de santé publique. L'infertilité est dans près de 60 % des cas d'origine, au moins en partie, féminine et 30% d'origine masculine. Plusieurs étiologies féminines sont impliquées avec notamment l'endométriose et le syndrome des ovaires polykystiques puis l'insuffisance ovarienne primitive ou IOP.

L'IOP correspond à un arrêt prématuré de la fonction ovarienne et se définit par l'occurrence d'une aménorrhée ou d'une spanioménorrhée de plus de 4 mois survenant avant l'âge de 40 ans et associé à un taux plasmatique de FSH supérieur à 25UI/L (Rossetti *et al.*, 2017; Huhtaniemi *et al.*, 2018a). Elle entraîne le plus souvent une infertilité permanente et des complications sévères : ostéoporose, maladies cardiovasculaires et même maladies neurologiques dégénératives mais également une diminution de la longévité. Malgré un bilan étiologique exhaustif, l'étiologie reste inconnue dans 70-80% des cas (Rossetti *et al.*, 2017; Huhtaniemi *et al.*, 2018a).

Dans ce travail de thèse, nous discutons l'apport de la génétique par séquençage nouvelle génération (NGS) dans le diagnostic étiologique et la prise en charge des patientes atteintes d'IOP et le lien entre infertilité et cancer. Nous démontrons que l'étude génétique aboutit à une médecine personnalisée.

ETAT DE LA QUESTION

2.1 OVAIRE ET RESERVE OVARIENNE

L'ovaire, l'organe reproductif féminin est constitué de deux parties ; une zone médullaire centrale composée de tissu conjonctif vascularisé et énervé et un cortex en périphérie qui est le siège de la folliculogénèse. Il a une fonction exocrine qui consiste à produire des ovocytes qui seront ovulés et aptes à être fécondés et une fonction endocrine de production d'hormones stéroïdes essentielles à la fonction ovarienne et au développement des caractères sexuels secondaires. Il est sous le contrôle hypothalamo-hypophysaire par l'action de deux hormones FSH et LH sécrétées sous l'action des pulses de la GnRH hypothalamique. Un feedback négatif est assuré par la sécrétion hormonale de l'ovaire (estradiol et progestérone) pour réguler les secrétions de l'hypothalamus (GnRH) et de l'hypophyse (FSH et LH).

Dans l'espèce humaine, l'ovaire et le testicule sont issues de la différentiation de la gonade bipotentielle à la surface du mésonéphros très tôt dans l'embryogénèse (3eme semaine de grossesse) (Figure 1). Cette différentiation est finement régulée et est sous le contrôle de plusieurs facteurs de transcription notamment *SF1(NR5A1), WT1, SOX9, FOXL2, RSPO1* et *WNT4* (Figure 1). La gonade bipotentielle est ensuite colonisée par des cellules germinales primordiales, précurseurs des spermatozoïdes et des ovocytes, qui proviennent de la base de l'allantoïde, dès la 4eme semaine de développement chez le fœtus humain. Après cette migration, les cellules germinales primordiales, devenues alors des ovogonies chez le fœtus femelle, se multiplient par mitose pour atteindre un maximum de 6 à 7.000.000 dans l'espèce humaine au 7eme mois de la vie intrautérine et qui ne cesseront ensuite de diminuer tout au long de la vie intra-utérine jusqu'à la ménopause (Huhtaniemi *et al.*, 2018a). Aux alentours de 12

semaines de grossesse, les ovogonies vont entrer en méiose, et deviennent des ovocytes qui progressent à travers les premiers stades de la prophase de la première division méiotique : leptotène, zygotène, pachytène jusqu'au stade diplotène dans lequel ils vont rester bloqués jusqu'à la puberté. Ces follicules de la réserve, appelés follicules primordiaux (FP), sont constitués d'un ovocyte bloqué en prophase de première division de méiose, entouré de quelques cellules somatiques allongées, appelées cellules de la granulosa (Hummitzsch *et al.*, 2013). C'est ce qui définit la réserve ovarienne qui ne cesse de décroitre tout au long de la vie d'une femme.

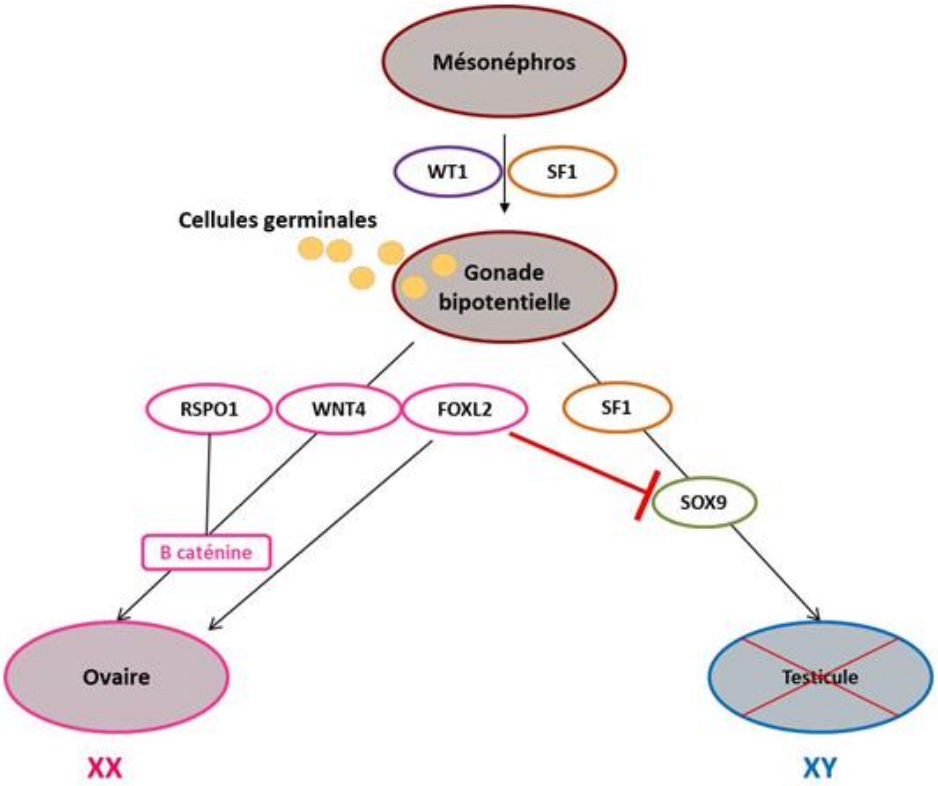


Figure 1 : Représentation schématique de la différentiation des *gonades* (Sonigo, 2018)

2.2 LA FOLLICULOGENESE

La folliculogénèse correspond à une succession de phase de division et de différentiation cellulaire permettant à une partie des FP de se différentier jusqu'au stade antral puis l'ovulation (Figure 2).

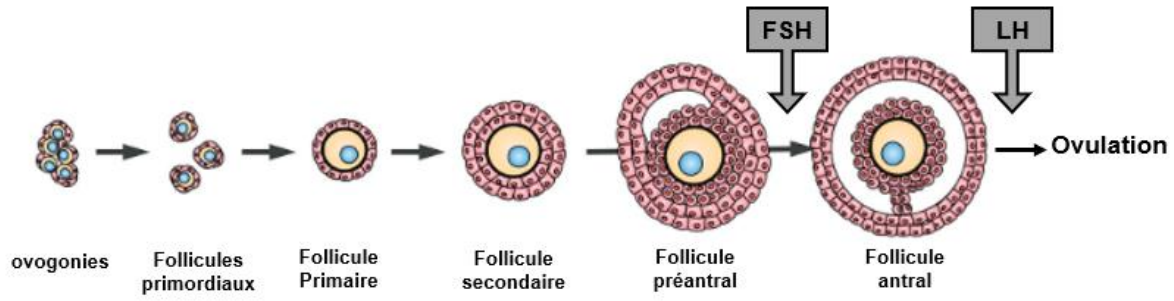


Figure 2 : Représentation schématique de la folliculogénèse (adaptée de Elzaiat *et al.*, 2017)

Une communication étroite entre l'ovocyte et les cellules somatiques qui l'entourent est primordiale pour le bon déroulement de la folliculogénèse (Zhang *et al.*, 2018b). En effet, la majorité des FP resteront à l'état quiescent sous l'effet de divers facteurs de signalisation et/ou de transcription exprimés par les ovocytes comme Foxo3 ou Lhx8 qui sont les effecteurs de la voie de signalisation PI3K/Akt (Huhtaniemi *et al.*, 2018a). La suppression ciblée des facteurs stimulant cette voie dans l'ovocyte bloque l'activation folliculaire et induit l'apoptose du FP, tandis que la perte des facteurs inhibiteurs (Pten, Tsc1, Tsc2, Stk11) entraîne une activation globale de FP responsable d'un épuisement du stock folliculaire et d'une infertilité (Reddy *et al.*, 2010; Huhtaniemi *et al.*, 2018a).

Le recrutement de FP pour débuter la folliculogénèse est initié chez la femme à 17 semaines de gestation sous l'effet d'autres facteurs ovocytaires comme NOBOX,

SOHLH1et 2 (Huhtaniemi *et al.*, 2018a). Il existe donc une balance entre des facteurs qui activent l'activation folliculaire et d'autres qui l'inhibent et donc maintenir ainsi les FP à l'état quiescent. Par la suite, la folliculogénèse peut être divisée en deux phases successives, une folliculogénèse basale indépendante des gonadotrophines hypophysaire (FSH et LH) puis la folliculogénèse terminale qui conduit à l'ovulation sous l'effet des gonadotrophines (Figure 2). La croissance folliculaire précoce ou basale jusqu'au stade préantral est indépendante des gonadotrophines et repose sur des facteurs intraovariens. Cela nécessite un dialogue coordonné entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa, dans lequel les voies SMAD et PI3K/Akt sont importantes (Persani *et al.*, 2014; Huhtaniemi *et al.*, 2018a). De même, l'inhibition de la voie PI3K/Akt conduit au blocage de la croissance folliculaire au stade du follicule primaire. Ceci révèle que la voie de signalisation PI3K/Akt joue non seulement un rôle dans l'activation du FP, mais également dans la survie et le développement des follicules au-delà du stade primaire (Chen *et al.*, 2015).

La progression vers les stades finaux du développement folliculaire dépend des gonadotrophines FSH et de LH. La suppression de FSHR, le récepteur de FSH dans des modèles murins entraîne une augmentation du taux d'atrésie, avec des follicules qui ne parviennent pas à passer au stade antral (Abel *et al.*, 2000; Huhtaniemi *et al.*, 2018a). Par ailleurs, l'action de la LH est indispensable à l'ovulation, à la reprise méiotique des ovocytes et à l'expansion du cumulus (Huhtaniemi *et al.*, 2018a). La perte d'action de la LH entraîne donc également l'infertilité car le développement des follicules est bloqué au stade antral (Huhtaniemi *et al.*, 2018a). En l'absence d'action des stéroïdes sexuels, les stades finaux du développement folliculaire présentent des

anomalies conduisant à l'arrêt folliculaire, comme illustré dans les modèles de souris dépourvus de fonction androgène ou œstrogène (Huhtaniemi *et al.*, 2018a).

Ce processus de folliculogénèse continue tout au long de la vie extra-utérine jusqu'à l'épuisement du stock folliculaire au moment de la ménopause. En effet, alors qu'elle est de 6 à 7 millions au 7ème mois de grossesse, il ne restera que ~ 1 à 2 millions de follicules à la naissance puis ~ 400 000 à la puberté (Figure 3) (Baker, 1963; Huhtaniemi *et al.*, 2018a) (Voir la revue générale de l'annexe page 269). Une femme ovule en moyenne 400 fois mais la majorité des follicules évoluent vers l'atrésie (Huhtaniemi *et al.*, 2018a).

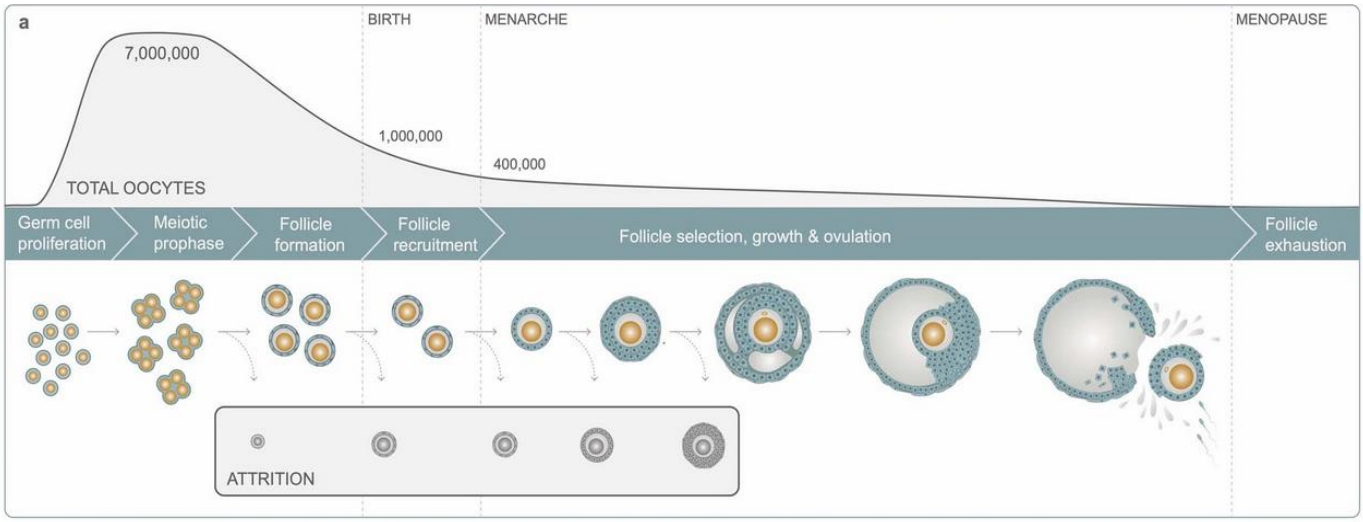


Figure 3 : Folliculogénèse et évolution de la réserve ovarienne de la vie anténatale jusqu'à la ménopause (adaptée de (Ruth *et al.*, 2021)**)**

2.3 DEFINITION DE L'IOP

L'IOP, ou hypogonadisme hypergonadotrope, correspond à l'arrêt des fonctions ovariennes et se manifeste cliniquement par une aménorrhée ou une spanioménorrhée de plus de 4 mois associée à des taux plasmatiques élevés de FSH ≥ 25UI/l signant l'origine périphérique ou primitive de cette affection (donc ovarienne) et survenant avant 40 ans (Huhtaniemi *et al.*, 2018a; Lagergren *et al.*, 2018; Golezar *et al.*, 2019). L'âge limite de 40 ans est utilisé car il représente deux écarts-types en dessous de l'âge moyen de ménopause naturelle (âge moyen de 50 ans allant de 40 à 60 ans). Plusieurs nomenclatures ont été proposées pour décrire ce syndrome ; Insuffisance ovarienne « primaire » pour indiquer que le défaut est « primaire" au niveau de l'ovaire. D'autres auteurs préfèrent utiliser le terme « prématurée » et « l'insuffisance », plutôt que l'échec « Failure », car l'IOP peut être associée à une reprise intermittente de l'activité ovarienne chez 15 à 25 % des femmes (Bachelot *et al.*, 2009; De Vos *et al.*, 2010). L'ensemble de ces facteurs entraînent souvent un retard dans le diagnostic et le traitement des IOP.

2.4 PHYSIOPATHOLOGIE DE L'IOP

Trois grands mécanismes peuvent être identifiés: Il peut s'agir d'une anomalie de l'établissement du capital folliculaire avant la naissance, d'une altération de la croissance folliculaire à partir de la puberté, ou d'une augmentation de l'atrésie folliculaire (Rossetti *et al.*, 2017; Huhtaniemi *et al.*, 2018a).

2.5 EPIDEMIOLOGIE DE L'IOP

La prévalence de ce syndrome est de l'ordre de 1 à 3.7% et varie en fonction de l'âge de diagnostic et de l'ethnie mais probablement également dans le temps (Lagergren *et al.*, 2018; Golezar *et al.*, 2019). L'origine ethnique a une influence sur la prévalence de l'IOP. Dans une étude incluant 11,206 femmes, la prévalence globale de l'IOP était de 1.1 % mais varie en fonction de l'origine ethnique de 0.1 % dans la population japonaise, 0.5% chez les femmes d'origine chinoise et jusqu'à 1.4% chez les femmes afro-américaines ou d'origine hispanique (Luborsky *et al.*, 2003). Cette prévalence est également variable en fonction de l'âge du diagnostic. On l'estime de 1 à 1.9/100 avant 40 ans, 1/1000 avant 30 ans et 1/10.000 avant 20 ans (Maclaran and Panay, 2015; Rossetti *et al.*, 2017; Huhtaniemi *et al.*, 2018a; Lagergren *et al.*, 2018; Panay *et al.*, 2020). A partir des données d'une cohorte suédoise de 1,036,918 femmes nées de 1973 à 1993, la prévalence de l'IOP était de 1.9%, IC95% [1.7-2.1](Lagergren *et al.*, 2018). Une étude incluant 51 450 femmes ménopausées suivies dans neuf pays (Royaume-Uni, Pays Scandinaves, Australie et Japon) a estimé la prévalence de l'IOP à 2% (Mishra *et al.*, 2017). Enfin, une méta-analyse récente incluant 31 études chez un total de 157,731 femmes ménopausées a estimé la prévalence de l'IOP à 3.7% (Golezar *et al.*, 2019).

2.6 COMPLICATIONS ASSOCIEES A L'IOP

L'IOP est responsable d'une morbidité importante attribuée notamment à la carence en stéroïdes incluant ostéoporose, maladies cardiovasculaires, déclin cognitif et maladie neurologique comme la maladie de Parkinson et la démence sénile (Huhtaniemi *et al.*, 2018a). Elle est également considérée comme un facteur de risque

à part entière pour les maladies cardiovasculaires (Stevenson *et al.*, 2021; Nappi *et al.*, 2022). De plus, plusieurs études épidémiologiques ont montré un lien direct entre infertilité, IOP et la diminution de l'espérance de vie (cf. plus bas).

2.6.1 Maladies cardiovasculaires

Il est désormais bien établi que les femmes atteintes d'IOP ont un risque accru de maladies cardio-vasculaires avec un surrisque estimé à 50 à 60 % (Stevenson *et al.*, 2021).Une étude récente incluant 11.258 femmes Australiennes âgées de 45-50 ans au moment de l'inclusion et suivies pendant 20 ans (1996-2016) a démontré que les femmes atteintes d'IOP (2.3% de la cohorte) avaient trois fois plus de risque de développer des comorbidités et des maladies chroniques (diabète, hypertension, maladie cardiaque, accident vasculaire cérébral, arthrite, ostéoporose, asthme, Bronchopneumopathie chronique obstructive-BPCO, dépression, anxiété et cancer du sein) vers la soixantaine comparée aux femmes ménopausées à l'âge de 50-51 ans (RR 3.03, IC95% 1.62 -5.64) (Panay *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020). Une métanalyse incluant 190,588 femmes suivies pendant 4 à 37 ans, a démontré que les femmes avec IOP ont un risque élevé de mortalité cardiovasculaire globale (RR 1,61, IC à 95 % 1,22-2,12, p = 0,0007) et en particulier par cardiopathie ischémique (RR 1,69, IC à 95 % 1,29-2,21, p = 0,0001) (Roeters van Lennep *et al.*, 2016). Une deuxième méta-analyse incluant 301,438 femmes de cinq pays (Australie, Pays Scandinaves, États-Unis, Japon et Royaume-Uni) a démontré que l'IOP est associée à un risque accru de maladie cardiovasculaire (HR 1,55, IC à 95 % 1,38-1,73, p<0·0001)(Zhu *et al.*, 2019). Cette même étude a démontré qu'il existe également un risque élevé d'accident vasculaire cérébraux (HR 1,72, IC à 95 % 1,43–2,07, p<0·0001) (Zhu *et al.*, 2019).

Très récemment, une autre étude incluant plus d'un million de femmes coréennes dont 28111 avec IOP et suivies pendant une durée moyenne de 9 ans, a révélé un lien entre l'âge de la ménopause et le risque de survenue d'une insuffisance cardiaque ou d'une fibrillation auriculaire (Shin *et al.*, 2022). En effet, les femmes ménopausées avant 40 ans avaient un HR supérieur de 33 % (1,33, IC à 95 % : 1,26-1,40) de développer une insuffisance cardiaque et un HR supérieur de 9 % (1,09, IC à 95 % : 1,02-1,16) de développer une fibrillation auriculaire par rapport à celles ménopausées après 50 ans (Shin *et al.*, 2022).

Enfin les femmes atteintes d'IOP ont un risque accru de thrombose veineuse profonde par rapport aux femmes ménopausées après 40 ans (HR 1,8, IC à 95 % 1,2 à 2,7)(Canonico *et al.*, 2014; Stevenson *et al.*, 2021).

2.6.2 Diabète et syndrome métabolique

La carence oestrogénique peut altérer la répartition des graisses corporelles, la sensibilité à l'insuline et l'équilibre glycémique (Nappi *et al.*, 2022). Plusieurs études cas-témoins ont montré que les femmes atteintes d'IOP avaient un tour de taille et un rapport taille-hanche élevés par rapport aux femmes ménopausées après 50 ans (Stevenson *et al.*, 2021). Une étude incluant 98 patientes avec IOP a montré des niveaux de glycémie élevés chez les patientes avec IOP comparé au contrôle et ce malgré un IMC normal et une sensibilité à l'insuline plus faible que les témoins (Gunning *et al.*, 2019; Stevenson *et al.*, 2021). De plus, deux études indépendantes ont démontré que la prévalence du syndrome métabolique était 4 fois plus élevée chez les patientes avec IOP comparé aux témoins, 16% vs 3% and 14.3% vs 3.4% (Ates *et al.*, 2014; Gunning *et al.*, 2020). Enfin, une méta-analyse récente incluant 191,762

femmes, les femmes atteintes d'IOP avaient un risque 53% plus élevé de développer un diabète par rapport aux femmes ménopausées après 45 ans :OR: 1.53, 95% CI: 1.03-2.27, p = 0.035 (Anagnostis *et al.*, 2019a).

2.6.3 Dyslipidémie

La carence oestrogénique est également associée à des altérations du profil lipidique, avec une augmentation des triglycérides, du LDL cholestérol et une baisse du HDL cholestérol (Stevenson *et al.*, 2021). Dans une étude incluant 144,260 femmes ménopausées au Royaume-Uni, l'IOP était associée à un risque élevé de dyslipidémie par rapport aux femmes ménopausées après 50 ans (HR= 2,36, IC 95% [1,16-1,61] ; p < 0,001)(Honigberg *et al.*, 2019). Dans une étude cas-témoins incluant 98 femmes danoises présentant une IOP, les auteurs rapportent une augmentation significative du cholestérol total et du LDL- cholestérol mais sans différence significative pour les triglycérides (Gunning *et al.*, 2019).

2.6.4 Ostéoporose

L'IOP est associée à une diminution de la densité osseuse, une ostéoporose et d'une élévation du risque de fracture (Lambrinoudaki *et al.*, 2021). Une méta-analyse incluant 462.393 femmes a montré que les femmes ménopausées avant 45 ans avaient un risque plus élevé de fracture de 36 % par rapport aux femmes ménopausées après 45 ans (OR 1.36, IC95% : 1.11-1.66, p < 0.002)(Anagnostis *et al.*, 2019b). Un étude récente incluant 1,272,115 femmes coréennes a retrouvé des résultats similaires sur le risque de fracture en fonction de l'âge de la ménopause (Yoo *et al.*, 2021).

2.6.5 Déclin cognitif, risque de démence et dépression

Les études sur l'association entre le déclin cognitif et l'IOP sont limitées. Cette association est déduite des extrapolations de données issues de la ménopause de cause chirurgicale (Lambrinoudaki *et al.*, 2021). En effet, les femmes ayant subi une ovariectomie bilatérale avant 45 ans ont un risque élevé de développer une démence et un déclin cognitif ; HR: 1.70, 95%CI: 1.07-2.69 (Georgakis *et al.*, 2019). En revanche, les femmes atteintes d'IOP ont un risque accru de syndrome dépressif y compris des formes sévères (Lambrinoudaki *et al.*, 2021).

2.6.6 Lien entre IOP, Infertilité, Ménopause et espérance de vie

La ménopause est un phénomène physiologique qui signe l'arrêt de la fonction reproductive chez la femme et résulte de l'épuisement du capital folliculaire, qui est constitué dès la vie anténatale une fois pour toute. De plus, ce stock folliculaire subit une dégénérescence physiologique rapide qui continue tout au long de la vie de la femme jusqu'à la ménopause. La ménopause survient quand le nombre de follicules est inférieur à 1000 follicules (Huhtaniemi *et al.*, 2018a). L'âge moyen de survenue de la ménopause naturelle chez des femmes d'origine européenne est de 51 ans, mais peut aller de 40 à 60 ans (te Velde and Pearson, 2002; Mishra *et al.*, 2017; InterLACE Study Team, 2019). On distingue souvent une ménopause dite précoce quand l'arrêt des cycles survient avant 45 ans et cela concerne 5% des femmes dans la population générale (te Velde and Pearson, 2002). L'arrêt des règles avant 40 ans dont l'origine est ovarienne correspond à l'IOP dans environ 1 à 3.7% des cas (cf. plus haut). Des facteurs environnementaux influencent l'âge de la ménopause notamment le tabac, mais un déterminisme génétique explique une grande partie la variance de l'âge de la

ménopause. Une mère ayant un âge précoce de ménopause multiplie par 6 le risque de ménopause précoce ou d'IOP chez ses filles (Huhtaniemi *et al.*, 2018a). Une étude récente cas-témoins a estimé que les apparentées de premier degré ont jusqu'à 18 fois plus de risque de développer une IOP, RR=18,52, IC à 95 % 10,12–31,07) alors que les apparentées au deuxième degré ont un risque multiplié par 4 (RR, 4,21 ; IC, 1,15–10,79)(Verrilli *et al.*, 2022). L'étude de jumelles monozygotes a montré que l'âge de la ménopause est héréditaire avec un taux de concordance allant de 44 à 85% (te Velde and Pearson, 2002) et que les facteurs environnementaux jouent un rôle minime (Snieder *et al.*, 1998; Do *et acl.*, 2000; Gosden *et al.*, 2007).

Des études épidémiologiques ont révélé une association entre l'âge de la ménopause et la mortalité toutes causes confondues (Laven *et al.*, 2016; Senapati, 2018; McGrath *et al.*, 2021). L'étude d'une cohorte prospective de 68,000 femmes américaines non fumeuses avec une ménopause physiologique et sans traitement hormonal substitutif, a montré que le taux de mortalité toutes causes confondues était plus élevé chez les femmes avec une ménopause précoce entre 40-44 ans qu'entre 50-54 ans (Mondul *et al.*, 2005). La mortalité est réduite de 2% par année d'âge supplémentaire de la ménopause (Ossewaarde *et al.*, 2005). L'espérance de vie des femmes ménopausées après 55 ans était de 2 ans de plus que celle des femmes présentant une IOP (Figure 4) (Ossewaarde *et al.*, 2005). Une autre étude chez plus de 5000 femmes américaines d'origine Caucasienne a montré une

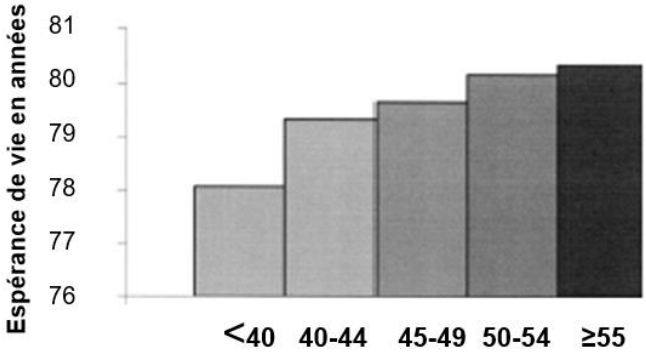


Figure 4 : Espérance de vie selon l' âge de la ménopause (adapté de Ossewaarde et al., 2005)

association négative entre l'âge de la ménopause naturelle et la mortalité toutes causes confondues (Snowdon *et al.*, 1989).

On peut spéculer que la carence oestrogénique qui caractérise l'arrêt de la fonction ovarienne est à l'origine de cette surmortalité. En effet, la baisse de l'estrogène peut être à l'origine de comorbidités multiples incluant ostéoporose, maladies cardiovasculaires, diabète, dérégulation du métabolisme des lipides (cf. plus haut) (De Vos *et al.*, 2010; Huhtaniemi *et al.*, 2018a). Mais les nouvelles études épidémiologiques révèlent que l'infertilité est un indicateur prédictif indépendant de morbidité et de mortalité. En effet, au moins 3 grandes études épidémiologiques récentes à partir de larges cohortes de femmes infertiles Nord-Américaines avec des origines ethniques différentes (Hispanique, Afro-américaine, Caucasienne, Asiatique) ont révélé que les femmes infertiles ont un risque plus élevé de mortalité toutes causes confondues mais également de mortalité liée à un cancer par rapport aux femmes fertiles (Stentz *et al.*, 2020; Murugappan *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022). Une étude publiée en 2020 à partir d'une cohorte de 75,784 femmes âgées de 55 à 74 ans et suivies pendant un minimum de 10 ans a révélé que les femmes ayant une histoire d'infertilité (ménopause avant 40 ans, endométriose, anomalie tubaire…) ont un surrisque de décès de 26% par rapport aux femmes fertiles ; RR 1.26 IC95% [1.12-1.42], p<0.001(Stentz *et al.*, 2020). Ce surrisque de mortalité n'est pas associé aux maladies cardiovasculaires ni aux complications de diabète. En revanche, en cas d'infertilité, le risque de décès par cancer dans cette population était augmenté de 23%, RR1.23 IC95% [1.10-1.37], p<0.001 en particulier le décès par cancer de l'ovaire ; RR 2.64 IC95% [1.71-4.08], p<0.001. Cette étude révèle donc que l'infertilité est un facteur indépendant de risque pour le cancer du sein et peut donc avoir un effet direct sur la

morbidité et la mortalité (Stentz *et al.*, 2020). Une deuxième étude comparative, réalisée à partir d'une cohorte indépendante de 72,786 femmes avec infertilité suivies pendant 5 ans et 3.845.790 femmes sans infertilité, confirme l'association entre l'infertilité et la mortalité toutes causes confondues, RR 1.32 IC95% [1.18-1.32] (Murugappan *et al.*, 2021). Les femmes infertiles ayant pu avoir une grossesse ont également le même risque que celles n'ayant pas eu de grossesse : RR1.75, IC95% [1.14-2.70] contre 1.30 IC95% [1.16-1.46] (Murugappan *et al.*, 2021) respectivement. Ceci infirme les données antérieures sur la diminution de mortalité chez les femmes infertiles ayant pu avoir un enfant (Vassard *et al.*, 2018). De plus, recevoir un traitement de son infertilité (FIV…) n'augmente pas le risque de décès dans la population de femmes infertiles (Murugappan *et al.*, 2021). L'analyse par stratification en sous-groupe en fonction de l'âge (<35 ans, >35 ans), de comorbidités, de l'origine ethnique, présence ou absence de grossesse, ne modifie pas cette association entre infertilité et mortalité toute cause confondue (Murugappan *et al.*, 2021). Par exemple, cette association entre l'infertilité et la mortalité est présente chez les femmes infertiles sans comorbidités (Murugappan *et al.*, 2021). Ces résultats suggèrent que le risque accru de mortalité chez les femmes infertiles n'est pas uniquement attribué à l'âge ni aux comorbidités associées (Murugappan *et al.*, 2021). Une troisième étude épidémiologique incluant 101.777 femmes infertiles âgées de 25 à 42 ans, suivies pendant 28 ans, a confirmé également l'association entre l'infertilité et la mortalité précoce définie par un décès avant 70 ans, RR 1.26 IC95% [1.15-1.38] (Wang *et al.*, 2022). Cette mortalité précoce a été surtout associée à un décès par cancer RR 1.22 IC95% [1.08-1.39] et était plus élevée quand l'infertilité survenait avant 26 ans ; RR1.35 IC95% [1.19-1.52].

Ce lien, longtemps incompris, peut être expliqué par la génétique et la génomique qui ont mis en évidence le rôle majeur des gènes de méiose/réparation d'ADN, non seulement dans la longévité, mais aussi dans l'âge de la ménopause physiologique. En effet, plusieurs études d'association à l'échelle du génome (Génome Wide Association Study -GWAS) ont mis en évidence des centaines de polymorphismes pouvant influencer l'âge de la ménopause (He *et al.*, 2009; Stolk *et al.*, 2009, 2012; Day *et al.*, 2015; Ruth and Murray, 2016; Gajbhiye *et al.*, 2018; McGrath *et al.*, 2021). Une des premières études a inclus 69,360 femmes et a identifié 44 loci génomiques associés à l'âge de la ménopause naturelle, dont 29 contiennent des gènes de réparation des dommages de l'ADN (McGrath *et al.*, 2021). Un modèle reliant l'âge de la reproduction, la ménopause et la longévité a été proposé (Innan *et al.*, 2021). Une étude de GWAS récente incluant plus de 200.000 femmes a confirmé les données de l'étude précédente et a identifié au total 290 polymorphismes génétiques dont 74 situés à proximité ou au niveau des gènes de réparation de l'ADN pouvant influencer l'âge de la ménopause naturelle. L'effet de ces polymorphismes sur l'âge de la ménopause physiologique était de quelques semaines à plus d'un an (Ruth *et al.*, 2021). Ceci confirme ainsi le rôle majeur de cette voie moléculaire de réparation de l'ADN dans le déterminisme génétique de l'âge de la ménopause naturelle (Ruth *et al.*, 2021). Les dommages de l'ADN s'accumulent dans les follicules en raison de modifications du métabolisme cellulaire et de stress oxydatifs endogènes ou exogènes qui augmentent avec le vieillissement ovarien, mais également avec le vieillissement général de l'organisme (McGrath *et al.*, 2021). L'incapacité de réparer les dommages de l'ADN dans les cellules germinales et somatiques pourrait être un facteur prédisposant, expliquant un lien entre le vieillissement reproductif et le vieillissement

global, donc la longévité (McGrath *et al.*, 2021).

2.7 ETIOLOGIES

2.7.1 Étiologies auto-immunes

Il est estimé que 5-30% des IOPs seraient d'origine auto-immune (Silva *et al.*, 2014). L'incidence des maladies auto-immunes dans l'IOP est plus élevée que dans la population générale (Lambrinoudaki *et al.*, 2021). Jusqu'à 20 % des femmes atteintes d'IOP présentent des signes d'auto-immunité surrénalienne avec des signes histologiques d'ovarite auto-immune, et 10 à 20 % des patientes atteintes de la maladie d'Addison ont une IOP (Kirshenbaum and Orvieto, 2019). Les anticorps anti 21-hydroxylase sont présents chez environ 4 % des femmes atteintes d'IOP. De plus, l'IOP peut précéder l'apparition d'une insuffisance surrénalienne sévère (Silva *et al.*, 2014). La coexistence de signe d'auto-immunité comme la thyroïdite de Hashimoto, un diabète de type 1, la polyarthrite rhumatoïde est fréquente (Lambrinoudaki *et al.*, 2021). Mais cela ne suffit pas pour confirmer l'origine auto-immune de l'IOP. Un bilan étiologique de ces patientes avec des stigmates d'auto-immunité doit être poursuivi. Le dosage des anticorps anti-ovariens n'est pas recommandé car non spécifique (Kirshenbaum and Orvieto, 2019; Lambrinoudaki *et al.*, 2021).

2.7.2 Étiologies infectieuses

L'origine infectieuse des IOP est rare (Lambrinoudaki *et al.*, 2021). Elle peut être secondaire à certaines infections tel que les oreillons et la tuberculose (Lambrinoudaki *et al.*, 2021). Un lien entre l'infection par le VIH et l'IOP a été suggéré soit en raison des médicaments antiviraux, soit du virus lui-même (Tariq *et al.*, 2016). En effet, les femmes atteintes par le VIH ont leur ménopause à un âge plus précoce

(Tariq *et al.*, 2016). Cependant , il n'existe pas à ce jour suffisamment de preuve pour recommander la sérologie VIH dans le bilan étiologique de l'IOP (Lambrinoudaki *et al.*, 2021).

2.7.3 Étiologies toxiques

Divers facteurs environnementaux notamment des polluants tels que les phtalates, le bisphénol A et les hydrocarbures aromatiques polycycliques qu'on retrouve dans la fumée de cigarette sont impliqués dans environ 10 % des IOP (Vabre *et al.*, 2017; Huhtaniemi *et al.*, 2018a). L'association entre le tabac et l'âge de la ménopause a été établi. En effet, les femmes qui fument ont un risque plus élevé de développer une ménopause plus précocement que les non-fumeuses (Yang *et al.*, 2015). Les polluants peuvent affecter gravement la croissance et la viabilité des follicules et donc de la réserve ovarienne (Huhtaniemi *et al.*, 2018a) ou être à l'origine de modification épigénétique de la lignée germinale (Nilsson *et al.*, 2012; Huhtaniemi *et al.*, 2018a). Cela renforce le conseil d'éviter de fumer, en particulier chez les femmes cherchant à optimiser leur fertilité. Des mesures de santé au travail appropriées devraient également être mises en place pour éviter l'exposition aux polluants environnementaux tels que les phtalates et le bisphénol-A (Lambrinoudaki *et al.*, 2021).

2.7.4 Étiologies iatrogènes

La proportion d'IOP iatrogène à la suite d'une chimiothérapie, d'une radiothérapie, ou d'une chirurgie ovarienne augmente à mesure que les taux de survie des enfants et des jeunes femmes adultes atteintes de cancer continuent de s'améliorer (Lambrinoudaki *et al.*, 2021; Siegel *et al.*, 2022). La gonadotoxicité de la

chimiothérapie est différente en fonction des molécules utilisées (Donnez *et al.*, 2006; De Vos *et al.*, 2010). Les femmes qui ont reçu des anthracyclines et des agents alkylants ont un risque très élevé d'IOP (Spears *et al.*, 2019). La génotoxicité de ces chimiothérapies peut être liée à une altération directe de l'ADN des ovocytes entraînant une atrésie folliculaire (Winship *et al.*, 2018) mais également, et d'une façon contre-intuitive, d'une entrée en croissance massive des follicules primordiaux provoquant ainsi une déplétion accélérée de la réserve ovarienne (Kalich-Philosoph *et al.*, 2013). Par ailleurs, la chimiothérapie peut être à l'origine d'une toxicité vasculaire (Ben-Aharon *et al.*, 2012). Des consultations d'oncofertilité sont proposées aux jeunes femmes chez qui un diagnostic de cancer a été fait pour leur donner des conseils adéquats sur la fertilité ainsi que sur la santé à court et à long terme liée à la carence en œstrogènes (Sonigo *et al.*, 2019; Lambrinoudaki *et al.*, 2021)

2.7.5 Etiologies chromosomiques

Le syndrome de Turner est une affection génétique affectant 1/2500 nouveau-nés de sexe féminin (Sybert and McCauley, 2004). Il associe une petite taille et une insuffisance ovarienne et de manière inconstante d'autres malformations congénitales notamment cardiaque et rénale ou des comorbidités (rénales, osseuses, ORL, endocriniennes, auto-immunes, stomatologiques, psychologiques). Le niveau intellectuel est dans la moyenne chez ces patientes hormis en cas de présence d'un chromosome X en anneau et des difficultés d'apprentissage décrites chez quelques patientes (Hook and Warburton, 2014; Rossetti *et al.*, 2017). Il est lié à une absence totale ou partielle d'un chromosome X (45, X) dans environ 40-50 %, des mosaïques (45,X/46,XX) et plus rarement par des anomalies de

structure du chromosome X (délétion partielle du bras long ou du bras court du chromosome X, iso-chromosome X, chromosome X en anneau) (Hook and Warburton, 2014; Rossetti *et al.*, 2017). Les formes avec une mosaïque se définissant par la présence d'au moins 5% de cellules (45,X) peuvent se manifester uniquement par une IOP. Les patientes avec un syndrome de Turner présentent souvent une aménorrhée primaire et un retard pubertaire (Rossetti *et al.*, 2017). Néanmoins, une puberté spontanée chez des patientes avec ce syndrome ont été décrite avec également quelques grossesses rapportées (Pasquino *et al.*, 1997; Livadas *et al.*, 2005).

D'autres anomalies chromosomiques ont été décrites chez des patientes avec IOP notamment des translocations entre le chromosome X et un autosome permettant la découverte de nouveaux gènes dans l'IOP (Di-Battista *et al.*, 2020). Ces anomalies chromosomiques ont permis également de suggérer deux régions sur le bras long du chromosome X qui seraient critiques pour le développement ovarien : POF1 et POF2 (pour *Premature Ovarian Failure 1 et 2*)(Rossetti *et al.*, 2017). De plus, des remaniements chromosomiques impliquant la région POF1 (Xq13-q21) ont été associés à une diminution de l'expression d'un certain nombre de gènes spécifiquement exprimés dans l'ovocyte suggérant une probable régulation épigénétique (Rizzolio *et al.*, 2009). L'association entre la présence d'un chromosome X surnuméraire (47, XXX) et l'IOP n'est pas clairement établie.

2.7.6 Etiologies monogéniques

2.7.6.1Prémutation du gène FMR1

FMR1 pour (*Fragile X mental retardation*) est un gène situé sur le chromosome X et contient une séquence répétée de trinucléotides CGG dans sa région 5′UTR, dont

les expansions peuvent entraîner des troubles neurologiques et reproductifs. Il s'agit du premier gène décrit en pathologie humaine dans les maladies dites par expansion de triplet (Oberlé *et al.*, 1991). En effet, ce nombre de répétitions est de 33 en moyenne. Une mutation complète, définie par un nombre de répétions supérieur à 200, est responsable du syndrome l'X fragile, une des premières causes de déficience intellectuelle chez le garçon. Une prémutation correspond à un nombre de répétition situé entre 55 et 200. Elle se manifeste chez l'homme par le syndrome FXTAS (*Fragile X Tremor Ataxia Syndrome*), une maladie neurodégénérative rare caractérisée par un tremblement intentionnel et une ataxie débutant à l'âge adulte après 60 ans et par une IOP chez la femme. Cependant, la pénétrance des prémutations dans l'IOP n'est que de 15-20% (Rossetti *et al.*, 2017). Le taux de détection de la prémutation dans l'IOP est de 3 à 5%(Huhtaniemi *et al.*, 2018a) . Malgré ce faible taux de positivité dans l'IOP, l'étude de ce gène est la seule réalisée en pratique clinique courante dans la majorité des centres y compris en France.

Le mécanisme impliquant les prémutations de *FMR1* et l'IOP n'est pas encore totalement très bien compris mais l'effet toxique du transcrit de ce gène est suggéré (Tassone *et al.*, 2000). Une étude récente a confirmé cet effet toxique des transcrits de *FMR1* dans des modèles cellulaires à partir des cellules de la granulosa (Rosario *et al.*, 2022).

2.7.6.2Causes monogéniques des IOP syndromiques

L'IOP a été décrite comme faisant partie d'un syndrome génétique associant d'autres symptômes. Ces syndromes ont permis des avancées majeures dans la connaissance de la physiopathologie ovarienne et des voies moléculaires impliquées

dans le développement de l'ovaire et de la folliculogénèse. De plus, la bonne connaissance de ces syndromes permet d'en rechercher les symptômes attentivement chez toute patiente présentant une IOP.

On compte à ce jour plus de 30 syndromes génétiques associant l'IOP (Tableau 1)(Huhtaniemi *et al.*, 2018a). Avec le développement des techniques de génétique moléculaire, de nombreux gènes à l'origine de ces formes syndromiques d'IOP ont été identifiés. Très schématiquement, on peut classer ces syndromes en 5 groupes selon le gène ou de la voie moléculaire altérés : (1) La réparation d'ADN et le vieillissement cellulaire prématuré, (2) le développement des gonades, (3) l'immunité, (4) la balance énergétique et la fonction mitochondriale, (5) le métabolisme des acides nucléiques. Les formes syndromiques d'IOP sont répertoriées dans le tableau 1. Dans ce qui suit on va se focaliser sur quelques syndromes bien connus.

Table 1 : Présentations cliniques des IOP syndromiques

Syndrome	Aménorrhée	Signes extraovariens	Gène(s)	Héritabilité	Référence(s)
1) Réparation de l'ADN Vieillissement prématuré					
Ataxie télangiectasie	AS	Déficit immunitaire, sensibilité accrue aux infections, ataxie cérébelleuse progressive, risque augmenté de cancers en particulier les leucémies et les lymphomes	ATM	AR	(Savitsky *et al.*, 1995)
Syndrome de Nijmegen	AS	Petite taille, microcéphalie, une dysmorphie faciale, des infections sino-pulmonaires récurrentes, une fréquence extrêmement élevée de tumeurs malignes.	NBN	AR	(Chrzanowska *et al.*, 2010)
Anémie de Fanconi	AP/AS	Retard de croissance avec petite taille, anomalies squelettiques, insuffisance médullaire, risque augmenté de cancers.	FANCA FANCC FANCG	AR	(Tsui and Crismani, 2019)
Syndrome LIG4	AP	Microcéphalie, dysmorphie faciale, retard de croissance et de développement, des anomalies cutanées, pancytopénie et déficit	XRCC4	AR	(de Bruin *et al.*, 2015)

		immunitaire.			
Syndrome de Bloom	AS	Retard de croissance pré- et postnatale, hypopigmentation cutanée, érythème télangiectasique, photosensibilité, sensibilité accrue aux infections, prédisposition au cancer	BLM	AR	(Ellis and German, 1996)
Syndrome de Werner	AS	Cataracte bilatérale, petite taille, des cheveux prématurément gris et fins, ulcère de la cheville, hyperkératose, peau tendue, taches de vieillesse, visage d'oiseau et atrophie sous-cutanée, diabète, risque élevé de développement de cancers, notamment sarcomes mésenchymateux et mélanomes	WRN	AR	(Yu *et al.*, 1996)
Syndrome Rothmund-Thomson	AS	Poïkilodermie, petite taille, des cheveux et cils et sourcils clairsemés, des anomalies osseuses congénitales et risque accru d'ostéosarcome et de carcinome à cellules squameuses	RECQL4	AR	(Kitao *et al.*, 1999)

Syndrome de Hutchinson-Gilford	AS	Cardiomyopathie dilatée, dystrophie musculaire, lipodystrophie, phénotype progeroide-like, dysplasie mandibulaire	LMNA	AD/AR	(McPherson *et al.*, 2009)
2) Le développement des gonades, folliculogénèse					
DSD par mutation de *WT1*	AP/AS	DSD, Néphropathie, hernie diaphragmatique, Tumeur de Wilms.	WT1	AD	(Wang *et al.*, 2015b)
DSD par mutation de *NR5A1*	AP/AS	DSD, Insuffisance surrénale	NR5A1	AD/AR	(Achermann *et al.*, 1999; Lourenço *et al.*, 2009)
Syndrome de blépharophimosis-ptosis-épicanthus inversus BPES	AP/AS	Blépharophimosis, ptosis, épicanthus inverse et télécanthus. Parfois des anomalies des voies lacrymales, des troubles de la réfraction, une amblyopie ou un strabisme	FOXL2	AD/AR	(Zlotogora *et al.*, 1983; Crisponi *et al.*, 2001)
Dysplasie acromésomélique de type Grebe	AP	Brachydactylie sévère avec déviation radiale des doigts, déviation ulnaire des mains, fusion des os carpiens/tarsiens, aplasie du péroné, pieds bots	BMPR1B	AR	(Lehmann et al., 2003; Demirhan et al., 2005)

		bilatéraux avec de petits pieds larges et des orteils courts			
Syndrome des synostoses multiples	AS	Symphalangisme, Surdité	NOG	AD	(Gong *et al.*, 1999; Kosaki *et al.*, 2004)
Pseudohypoparathyroïdie type 1A	AS	Brachydactylie, petite taille, hypocalcémie et hyperphosphatémie, hypothyroïdie,Obésité	GNAS	AD	(Namnoum *et al.*, 1998)
3) L'immunité					
Polyendocrinopathie auto-immune type 1	AP/AS	une candidose cutanéo-muqueuse, une hypoparathyroïdie, une insuffisance surrénale, un diabète , hépatite auto-immune, l'alopécie, vitiligo, malabsorption intestinale, gastrite atrophique	AIRE	AD/AR	(Ahonen *et al.*, 1990; Husebye *et al.*, 2018)
4) La balance énergétique et la mitochondrie					
Galactosémie	AP/AS	Difficultés alimentaires, léthargie, ictère néonatal, retard de croissance, cirrhose, cataracte, déficience intellectuelle,	GALT	AR	(Lee *et al.*, 2003; Rubio-Gozalbo *et al.*, 2019; Fridovich-Keil

		hypoglycémie.			and Berry, 2022)
Anomalie congénitale de la glycosylation de type 1a	AP/AS	Retard de croissance, microcéphalie, encéphalopathie, neuropathie périphérique, rétinite pigmentaire, myopathie cardiaque, hépatomégalie, syndrome néphrotique, retard psychomoteur.	PMM2	AR	(Matthijs *et al.*, 1997; Grunewald *et al.*, 2002; Vuillaumier-Barrot *et al.*, 2012)
Ophtalmoplégie externe progressive	AS	Ptosis, ophtalmoplégie externe progressive, surdité de perception, neuropathie axonale, faiblesse musculaire, ataxie, dysarthrie, dysphagie, syndrome parkinsonien.	POLG	AD/AR	(Luoma *et al.*, 2004; Hikmat *et al.*, 2017)
Syndrome de Perrault	AP/AS	Surdité de perception d'intensité modérée ou profonde, trouble neurologique	*CLPP* *ERAL1* *HARS2* *HSD17B4* *LARS2*	AR	(Lerat *et al.*, 2016; Faridi *et al.*, 2022)

			TWNK *PRORP* *RMND1* *TFAM*		
Dystrophie musculaire avec surdité et IOP	ND	Dystrophie musculaire avec élévation des CPK, insuffisance respiratoire restrictive, scoliose, surdité.	GGPS1	AR	(Foley *et al.*, 2020)
5) Métabolisme des protéines et Ubiquitination					
Dystrophie rétinienne avec ou sans atteinte ovarienne	AS	Dystrophie rétinienne, rétinite pigmentaire, goitre, déficience intellectuelle.	RCBTB1	AR	(Coppieters *et al.*, 2016)
Syndrome de Woodhouse-Sakati	AP	Hypogonadisme, une alopécie, un diabète, un déficit intellectuel et des mouvements choréo-athétoïdes, une dystonie et dysmorphie.	DCAF17 (C2orf37)	AR	(Alazami *et al.*, 2008)
6) Métabolisme des acides nucléiques					
Ovarioleucodystrophie	AP/AS	Syndrome cérébelleux et spastique, atteinte diffuse de la substance blanche sus-tentorielle	EIF2B2	AR	(Fogli *et al.*, 2003)

		en IRM, troubles cognitifs et un aspect neuropathologique de leucodystrophie	EIF2B4 EIF2B5		
Insuffisance somatotrope avec ou sans IOP	AP/AS	Retard de croissance sévère isolée avec une hypoplasie de l'antéhypophyse, insuffisance thyréotrope, hypoprolactinémie, déficience intellectuelle, une neuropathie ou une cataracte.	RNPC3	AR	(Argente *et al.*, 2014; Akin *et al.*, 2022)

AP : Aménorrhée Primaire ; AS : Aménorrhée secondaire ; AR : autosomique récessive ; AD : autosomique dominant ; DSD : Disorder of Sex Development

Le syndrome APECED :

Il s'agit de la première affection auto-immune décrite comme étant d'origine génétique (Ahonen *et al.*, 1990; Nagamine *et al.*, 1997; Björses *et al.*, 2000). Il s'agit de la polyendocrinopathie auto-immune de type 1, ou syndrome APECED (*Autoimmune Polyendocriniopathy-Candidosis-EctodermalL Dystroph*y), une maladie génétique qui débute classiquement dans l'enfance avant l'âge de 5 ans et qui associe au moins deux des trois signes cardinaux : une candidose cutanéo-muqueuse chronique, une hypoparathyroïdie et une insuffisance surrénale (maladie d'Addison) (Ahonen *et al.*, 1990; Husebye *et al.*, 2018). La prévalence de ce syndrome est estimée à 1/100.000 (Husebye *et al.*, 2018). La candidose, survenant souvent dès l'enfance, peut toucher particulièrement la muqueuse buccale, unguéale, plus rarement génitale, œsophagienne et intestinale. L'atteinte endocrinienne se manifeste essentiellement par une hypothyroïdie présente dans la majorité des cas, et une insuffisance surrénale très fréquente. L'insuffisance ovarienne chez la femme est présente dans 60% des cas souvent avant l'âge de 30 ans (Husebye *et al.*, 2018). D'autres manifestations auto-immunes ont été décrite comme le diabète de type 1, l'hépatite auto-immune, l'alopécie, vitiligo, hypoplasie de l'émail dentaire, malabsorption intestinale, gastrite atrophique. Il existe une variabilité phénotypique y compris au sein d'une même famille suggérant l'existence d'autres facteurs modificateurs génétiques ou environnementaux. En effet la triade classique n'est décrite que dans 40% des cas (Betterle *et al.*, 1998; Husebye *et al.*, 2018). Il existe un risque accru de survenue de carcinome épidermoïde par rapport à la population générale (Husebye *et al.*, 2018). Ce syndrome est secondaire à des mutations majoritairement homozygotes ou hétérozygotes composites du gène *AIRE* (*AutoImmune REgulator*), codant la protéine du même nom (Nagamine *et al.*, 1997; Björses *et al.*, 2000). A ce jour, c'est le seul

gène impliqué dans l'immunité et responsable d'une forme syndromique d'IOP. La protéine AIRE d'expression essentiellement thymique et lymphocytaire a un rôle de régulateur de la réponse immunitaire régulée par les cellules lymphocytaires T (Husebye *et al.*, 2018). On compte à ce jour plus de 100 mutations décrites (Husebye *et al.*, 2018). Quelques rares cas de mutations hétérozygotes avec un effet dominant négatif démontré ont été rapportés (Cetani *et al.*, 2001; Husebye *et al.*, 2018; Goldfarb *et al.*, 2021).

Le syndrome de blépharophimosis-ptosis-épicanthus inversus (BPES)

Il s'agit d'un syndrome congénital rare dont la prévalence est estimée à 1:50.000. Il est caractérisé par une malformation palpébrale bilatérale quasiment pathognomonique du syndrome (WAARDENBURG, 1961; Zlotogora *et al.*, 1983; Oley and Baraitser, 1988). Cette malformation palpébrale associe de façon constante quatre signes majeurs : un blépharophimosis, un ptosis, un épicanthus inverse et un télécanthus. D'autres affections oculaires peuvent être associées et qu'il conviendra donc de les rechercher comme des anomalies des voies lacrymales, des troubles de la réfraction, une amblyopie ou un strabisme. Cette association syndromique a été décrite pour la première fois en 1961 (WAARDENBURG, 1961). On distingue deux sous-types : le type 1 comportant une atteinte ophtalmique avec une IOP et le type 2 uniquement une atteinte ophtalmique (Zlotogora *et al.*, 1983). Les patientes présentant un BPES de type 1 ont souvent un développement pubertaire normal avec apparition d'une aménorrhée secondaire ou d'une spanioménorrhée (Verdin *et al.*, 1993; Huhtaniemi *et al.*, 2018a). La réserve ovarienne de ses patientes est très altérée (Huhtaniemi *et al.*, 2018a). Sur le plan moléculaire et à ce jour, seules les altérations moléculaires du gène *FOXL2* sont à l'origine de ce syndrome dans 90% des cas (Verdin *et al.*, 1993; Crisponi

et al., 2001; Elzaiat *et al.*, 2017). Ce gène code un facteur de transcription qui régule de multiples gènes impliqués dans le développement sexuel et des ovaires, le développement des paupières, le maintien de la stabilité du génome ainsi que de la prolifération cellulaire et de l'apoptose. Il peut s'agir d'une mutation ponctuelle dans 72% des cas, d'une délétion ou d'une duplication dans 10-15% des cas ou d'une altération moléculaire (délétion ou duplication) d'une région régulatrice en 3' ou 5' dans 5% des cas (Verdin *et al.*, 1993; Elzaiat *et al.*, 2017). Un hotspot mutationnel responsable de 30% des cas et correspondant à une duplication en phase dans l'exon1 (du résidu 14 à 24) a été rapporté (De Baere *et al.*, 2003; Caburet *et al.*, 2004). Plus de 100 mutations constitutionnelles ont été décrites à ce jour majoritairement de type perte de fonction (non-sens ou décalage de cadre de lecture) (Tucker, 2021). La pénétrance des mutations de ce gène est complète. Une seule grande famille avec BPES associée à une mutation homozygote de ce gène a été rapportée à ce jour (Nallathambi *et al.*, 2007). Il est à noter également que quelques formes isolées d'IOP sans malformations palpébrales et secondaire à des mutations hétérozygotes de *FOXL2* ont été rapportées (Harris *et al*, 2002; Laissue *et al*, 2009). Enfin, une mutation somatique hétérozygote et récurrente de ce gène (p.C134W) a été identifiée dans 95% des tumeurs de la granulosa, une forme rare de tumeur maligne de l'ovaire (Shah *et al.*, 2009; Jamieson *et al.*, 2010; Elzaiat *et al.*, 2017). Ceci souligne le rôle majeur de ce gène dans la tumorigénèse, la prolifération cellulaire et l'apoptose. Une étude récente a démontré le rôle de *FOXL2* dans la réparation d'ADN et la stabilité du génome (Jin *et al.*, 2020).

Le syndrome de Perrault

Le syndrome de Perrault est un syndrome génétique rare caractérisé par une

surdité dans les deux sexes et une IOP chez la femme (Lerat *et al.*, 2016; Faridi *et al.*, 2022). La surdité est bilatérale et peut être profonde ou modérée. Elle est soit congénitale diagnostiquée à la naissance ou au plus tard à l'adolescence (Lerat *et al.*, 2016; Faridi *et al.*, 2022). L'atteinte ovarienne peut se manifester soit par une aménorrhée primaire avec des ovaires atrophiques mais peut aussi être secondaire (Faridi *et al.*, 2022). D'autres manifestations cliniques ont été décrites dans ce syndrome à savoir un retard de croissance, rapporté dans la moitié des cas, des difficultés d'apprentissage et un retard de développement, une ataxie cérébelleuse et une neuropathie périphérique motrice et sensorielle (Jenkinson *et al.*, 2012; Lerat *et al.*, 2016; Demain *et al.*, 2017). Une variabilité phénotypique inter et intrafamiliale importante a été observée (Jenkinson *et al.*, 2012). La prévalence de ce syndrome rare est inconnue avec plus de 100 cas rapportés à ce jour (Faridi *et al.*, 2022). Sur le plan moléculaire, il existe à ce jour 7 gènes impliqués dans ce syndrome avec une héritabilité exclusivement autosomique récessive (*CLPP, ERAL1, HARS2, HSD17B4, LARS2, TWNK, PRORP*). Cependant, chez environ 60 à 70 % des personnes atteintes du syndrome de Perrault identifiées à ce jour, un diagnostic moléculaire ne peut être établi (Lerat *et al.*, 2016; Demain *et al.*, 2017). Ces gènes codent des protéines de fonction mitochondriale ou impliquées dans le métabolisme, notamment des acides gras. *HARS2* (Pierce *et al.*, 2011) et *LARS2* (Pierce *et al.*, 2013) codent des synthétases histidyl ou leucyl-ARNt mitochondriales impliquées dans la traduction des gènes codés par la mitochondrie. *CLPP* code une endopeptidase hautement conservée d'un complexe protéolytique mitochondrial dépendant de l'ATP (Jenkinson *et al.*, 2013). *TWNK(C10orf2)* code Twinkle, une hélicase mitochondriale essentielle à la réplication de l'ADN mitochondrial (Morino *et al.*, 2014). *ERAL1* code une protéine impliquée dans l'assemblage de la petite sous-unité ribosomale mitochondriale

(Chatzispyrou *et al.*, 2017). *KIAA0391 (PRORP)* code la sous-unité métallonucléase du complexe mitochondrial RNase P responsable du traitement de l'extrémité 5' des ARNt dans la mitochondrie (Hochberg *et al.*, 2021). Enfin, le gène *HSD17B4,* qui code la 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 4, une enzyme peroxysomale impliquée dans la ß-oxydation des acides gras et le métabolisme des stéroïdes, a également été impliqué dans le syndrome de Perrault (Pierce *et al.*, 2010). D'autres gènes également de fonction mitochondriale ou impliqués dans le métabolisme comme *RMND1*,*GGPS1 et TFAM* ont été proposés comme étiologie génétique possible du syndrome de Perrault. Ils sont responsable de phénotypes sévères incluant des troubles neurologiques centraux et périphériques mais uniquement quelques cas ont été rapportés à ce jour (Faridi *et al.*, 2022).

La galactosémie

La galactosémie est une maladie métabolique sévère à début néonatal qui se manifeste en général par des difficultés alimentaires, une léthargie et une atteinte hépatique sévère (Rubio-Gozalbo *et al.*, 2019). Il s'agit d'une maladie récessive autosomique causée par un déficit en enzyme galactose -1-phosphate uridylyltransférase par mutation bi-allélique du gène *GALT*. Sans traitement, basé sur un régime sans galactose au long court, l'issue est fatale. Sous traitement, des séquelles persistent à l'âge adulte avec essentiellement une déficience intellectuelle d'intensité variable, une cataracte et une cirrhose avec insuffisance hépatique (Rubio-Gozalbo *et al.*, 2019; Fridovich-Keil and Berry, 2022). L'incidence en Europe et en Amérique du Nord est d'environ 1:30 000-1:50 000 (Rubio-Gozalbo *et al.*, 2010).Chez les femmes qui survivent jusqu'à l'âge adulte, il s'y associe souvent une IOP (Rubio-Gozalbo *et al.*, 2010, 2019). L'aménorrhée peut être primaire ou secondaire. L'IOP

dans cette maladie serait liée à une accumulation du galactose au niveau de l'ovaire à des niveaux toxiques pour les follicules (Rubio-Gozalbo *et al.*, 2010, 2019). Sur le plan moléculaire, plus de 150 mutations causales ont été décrites dans le gène *GALT.* Cependant, plus de 70 % des cas sont causés par deux mutations récurrentes (p.Q188R et p.K285N)(Calderon *et al.*, 2007; Rossetti *et al.*, 2017). Paradoxalement, la fertilité chez les patientes atteintes de galactosémie est nettement meilleure que celle des autres causes d'IOP (van Erven *et al.*, 2017). En effet, il a été démontré que la possibilité de grossesse spontanée chez les patientes atteintes de galactosémie est estimée à 20% à 6 mois, 28% à 1 an et 48% à 2 ans soit jusqu'à 20 fois plus que celle des autres causes d'IOP (~5%)(van Erven *et al.*, 2017).

Syndromes d'instabilité chromosomique

Afin de protéger l'intégrité du matériel génétique face aux agressions endogènes et exogènes que subissent l'ADN, il existe une multitude de systèmes de réparation de l'ADN pouvant cibler chaque lésion spécifique (Figure 5) (Stringer *et al.*, 2018). Au moins 6 systèmes de réparation d'ADN sont connus à savoir: le système de réparation par excision de base (Base Excision Repair ; BER) pour la réparation des bases, le système MMR (Mismatch Repair) pour la correction des erreurs liées à la réplication, le système de réparation par excision de nucléotides (NER : Nucleotide Excision Repair), le système de réparation des pontages interbrin de l'ADN (interstrand crosslinks) (la voie de l'anémie de Fanconi (AF)), le système de réparation des cassures double brin (Double-Strand breaks ; DSB) soit par recombinaison homologue (Homologous Recombinaison ; HR) ou par recombinaison non homologue (Non-Homologous End-Joining; NHEJ) (Hoeijmakers, 2009; Stringer *et al.*, 2018). Cette réparation d'ADN est donc essentielle au maintien de la stabilité du génome. De ce

fait, les défauts de réparation de l'ADN entraînent une instabilité du génome et sont associés à des anomalies du développement et à une prédisposition au cancer (Hoeijmakers, 2009).

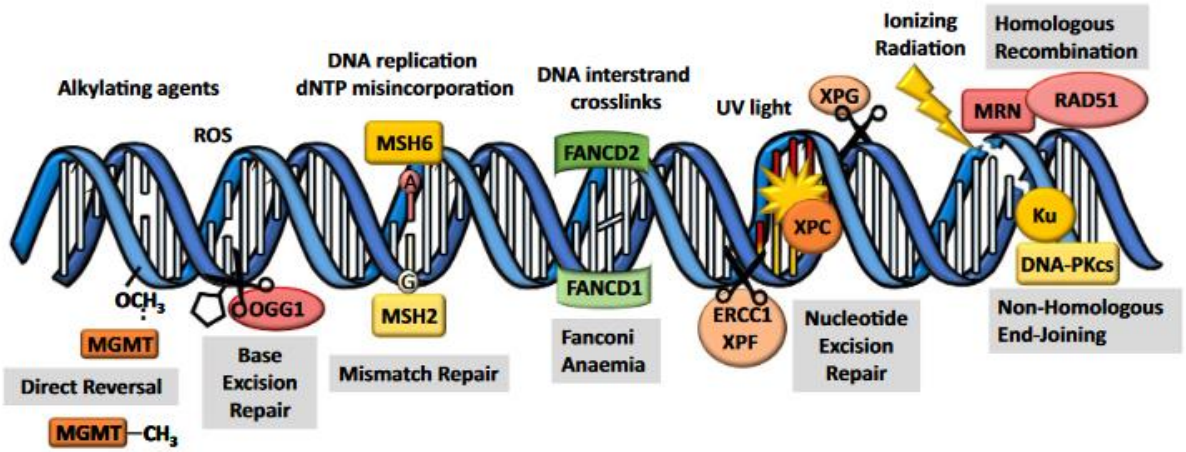


Figure 5 : Les différents systèmes de réparation d'ADN (Stringer *et al.*, 2018)

Les syndromes d'instabilité chromosomique sont un groupe de maladies rares, presque exclusivement de transmission récessive, caractérisés par une fragilité chromosomique en rapport avec une altération de l'une des voies de réparation de l'ADN (García-de Teresa *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2019). Ils se caractérisent cliniquement par une sensibilité accrue au cancer, un retard de croissance de début parfois anténatal et un vieillissement prématuré. Le pronostic de ces patients est très défavorable avec un décès survenant dans l'enfance ou l'adolescence (García-de Teresa *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2019). On peut citer par exemple, l'anémie de Fanconi, le syndrome de Bloom, l'ataxie télangiectasie, le syndrome de Nijmegen (Tableau 1).

L'Anémie de Fanconi (AF) est un syndrome génétique rare caractérisé par des anomalies du développement, un retard de croissance avec petite taille, une instabilité génétique, une insuffisance médullaire et une prédisposition au cancer avec parfois des anomalies squelettiques. Le cancer peut se développer au cours de la première

décennie de la vie et la mort survient souvent avant la puberté (Meyer *et al.*, 2014; García-de Teresa *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2019). Il s'agit d'une maladie rare avec une prévalence estimée à 5/1.000.000 en Europe (Meyer *et al.*, 2014).

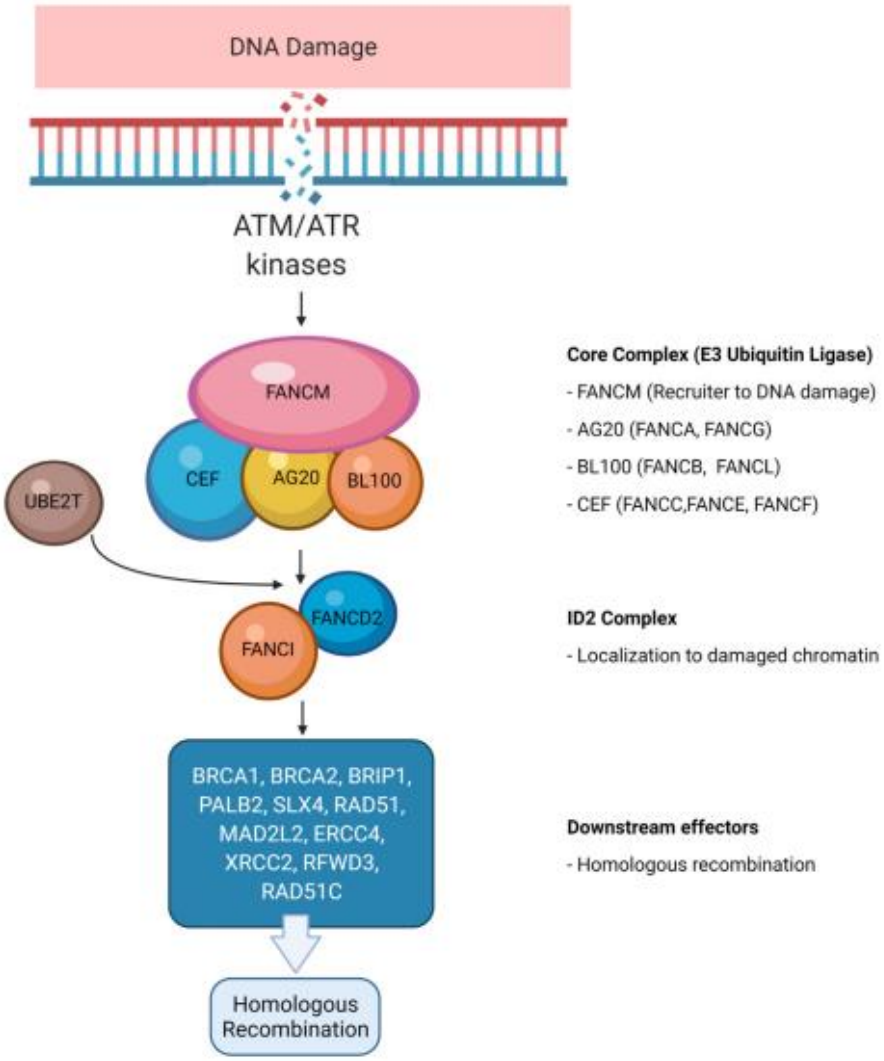


Figure 6 : La voie de réparation de l'ADN de Fanconi (Gianni *et al.*, 2022)

EIle est causée par la mutation de l'un des 22 gènes de la voie Fanconi (Figure 6). Cependant 80% des mutations affectent *FANCA, FANCG* et *FANCC* alors que *FANCE* et *FANCF* sont mutés dans environ 8% et *FANCD1* dans 3% des cas. Les 16 autres gènes de la voie Fanconi sont mutés d'une façon exceptionnelle (Taylor *et al.*, 2019). Dans la majorité des cas d'AF l'héritabilité est autosomique récessive à l'exception de

FANCB localisé sur le chromosome X (Meetei *et al.*, 2004) et *FANCR* (*RAD51)* pour lequel deux mutations *de novo* chez deux enfants présentant une AF avec effet dominant négatif démontré ont été rapportées (Ameziane *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015a). Le phénotype des patients avec mutation de *BRCA2 (FANCD1)* et *PALB2 (FANCN)* est plus sévère (Meyer *et al.*, 2014). Récemment, des observations rapportent des formes familiales d'AF causées par des mutations bi-alléliques de *BRCA2* chez des adolescentes ou des jeunes femmes adultes (Weinberg-Shukron *et al.*, 2018; Qin *et al.*, 2019; Turchetti *et al.*, 2019). Le spectre phénotypique de ce syndrome est donc très variable allant de syndrome polymalformatif de révélation néonatale voire anténatale à des anomalies hématologiques subtiles à l'âge adulte. L'étude cytogénétique met en évidence une fragilité chromosomique élevée en présence d'un agent intercalant comme la mitomycine ou le diépoxybutane (Auerbach, 2009). Ce signe est très caractéristique de l'AF (Auerbach, 2009; Oostra *et al.*, 2012). La mise en évidence d'une altération moléculaire de l'un des gènes de la voie Fanconi confirme le diagnostic. L'espérance de vie est de 27 ans (Taylor *et al.*, 2019).

Le syndrome de Bloom est une maladie autosomique récessive caractérisée sur le plan clinique par un retard de croissance pré- et post-natale, une hypopigmentation cutanée, un érythème télangiectasique photosensible du visage, une sensibilité accrue aux infections et une prédisposition au cancer (García-de Teresa *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2019). Sa prévalence est estimée à 2/1.000.000 (García-de Teresa *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2019). Il est causé par des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites du gène *BLM* qui code une hélicase impliquée dans le maintien de la stabilité du génome, la réplication, la recombinaison et la résolution des structures Holliday. BLM forme un complexe appelé BTRR avec 3 autres protéines TOP3A, RMI1

et RMI2 (Liu and West, 2008). Plus de 80 mutations tronquantes ou faux-sens du gène *BLM* ont été décrites à ce jour (Taylor *et al.*, 2019). Sur le plan cytogénétique, ce syndrome est caractérisé par l'augmentation franche (x 10 voir x100) du taux d'échanges de chromatides sœurs dans les cellules affectées, par rapport aux cellules normales (Chaganti *et al.*, 1974; García-de Teresa *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2019). Le diagnostic est aussi confirmé par la mise en évidence de mutation biallélique de *BLM*. Des formes moins sévères du syndrome de Bloom causées par des altérations moléculaires des autres protéines du complexe BTRR à savoir TOP3A, RMI1 et RMI2 ont été décrites (Hudson *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2018).

L'Ataxie télangiectasie : L'ataxie-télangiectasie est une maladie autosomique récessive caractérisée par un déficit immunitaire responsable d'une sensibilité accrue aux infections, une ataxie cérébelleuse progressive, des télangiectasies et un risque augmenté de cancer en particulier les leucémies et les lymphomes (García-de Teresa *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2019). La maladie débute classiquement entre l'âge de 1 et 4 ans mais des formes moins sévères diagnostiquées à l'adolescence ou à l'âge adulte ont été décrites (Chun and Gatti, 2004; Taylor *et al.*, 2019). Environ 30 % des patients ont des difficultés d'apprentissage ou un déficit intellectuel modéré. Un retard de croissance est assez fréquent. La prévalence moyenne est d'environ 3/1.000.000 enfants (Taylor *et al.*, 2019). Ce syndrome est causé par des mutations bi-alléliques du gène *ATM* qui code une protéine kinase jouant un rôle clé dans le contrôle de la réparation des cassures double brin de l'ADN. L'espérance de vie est de l'ordre de 25 ans même si quelques patients plus âgée (> 50 ans) ont été décrits (Dörk *et al.*, 2004). Les atteintes endocriniennes sont fréquentes notamment le diabète et l'IOP chez la femme.

Anomalie congénitale de glycosylation par mutations bi-alléliques de PMM2 :

Le spectre phénotypique de ce syndrome est assez large et de sévérité très variable (Matthijs *et al.*, 1997). En effet, il peut se manifester dès la naissance ou la petite enfance avec une ataxie, un retard global des acquisitions, des difficultés de succion et de déglutition voire une atteinte multiviscérale mettant en jeu le pronostic vital (Ferreira *et al.*, 2018; Péanne *et al.*, 2018). Il peut aussi se manifester dans l'enfance ou l'adolescence avec une déficience intellectuelle d'intensité variable, une ataxie, des troubles du langage, une épilepsie, des accidents vasculaires cérébraux et une rétinite pigmentaire, mais peut aussi se révéler très tardivement chez l'adulte soit avec une déficience intellectuelle modérée soit en étant paucisymptomatique se limitant uniquement à une atteinte ovarienne (IOP) (Vuillaumier-Barrot *et al.*, 2012). Quelques patients totalement asymptomatiques et porteurs d'une altération moléculaire de ce gène ont été également décrits (Vuillaumier-Barrot *et al.*, 2012). *PMM2* code une enzyme qui catalyse l'isomérisation du mannose 6-phosphate en mannose 1-phosphate, précurseur de la chaine oligosaccharidique de la N-glycosylation des protéines (Matthijs *et al.*, 1997; Grunewald *et al.*, 2002). L'IOP des femmes présentant une anomalie congénitale de la glycosylation en rapport avec une altération bi-allélique de *PMM2* peuvent présenter une aménorrhée primaire avec parfois absence de développement pubertaire, ou une aménorrhée secondaire. Quelques grossesses ont été décrites (Miller and Freeze, 2003).

Dystrophie rétinienne et IOP par mutations bi-alléliques de RCBTB1 :

L'inactivation bi-allélique de ce gène est responsable d'une forme syndromique de dystrophie rétinienne avec rétinite pigmentaire qui peut être soit isolée (Coppieters *et al.*, 2016; Catomeris *et al.*, 2022) ou multi systémique associant IOP, goitre,

déficience intellectuelle d'intensité modérée à sévère (Coppieters *et al.*, 2016). Ce gène code une protéine impliquée dans l'ubiquitination des protéines mais peut également avoir un rôle de régulateur du cycle cellulaire. Une étude transcriptomique sur 106 sarcomes des tissues mous a révélé que l'expression de ce gène est fortement réduite suggérant que ce gène peut avoir un rôle de suppresseur de tumeur (Mauduit *et al.*, 2019). De plus, la baisse de l'expression de ce gène est associée à un risque plus élevé de métastases et à un mauvais pronostic (Mauduit *et al.*, 2019). On compte à ce jour 9 familles rapportées avec dystrophie rétinienne dont uniquement 3 syndromiques incluant une IOP chez la femme (Coppieters *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2021; Catomeris *et al.*, 2022).

2.7.6.3Autres causes monogéniques.

La détermination des causes monogéniques, autres que la prémutation du gène *FMR1* et les gènes impliqués dans les formes syndromiques d'IOP a débuté par la stratégie de gène-candidat identifié sur la base de l'expression et la fonction du gène dans la folliculogénèse ou le développement ovarien, ou surtout sur l'impact de l'inactivation de ce gène dans le modèle murin correspondant. Cette approche a permis d'identifier un certain nombre de gènes impliqués dans l'IOP. On peut citer par exemple le gène codant le récepteur de la FSH comme la première cause monogénique de l'IOP (Aittomäki *et al.*, 1995; Beau *et al.*, 1998; Touraine *et al.*, 1999), ceux codant des facteurs de transcription spécifique de l'ovaire (*NOBOX, FIGLA*)(Qin *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008), impliqués dans le développement des gonades (*NR5A1, FOXL2*)(Crisponi *et al.*, 2001; Lourenço *et al.*, 2009) ou appartenant à la famille du TGFβ (*BMP15, GDF9*) (Di Pasquale *et al.*, 2004; Persani *et al.*, 2014).

FSHR : C'est le premier gène découvert dans l'IOP. Il code le récepteur de

l'hormone FSH et a été identifié par l'étude génétique de six familles consanguines d'origine Finlandaise (Aittomäki *et al.*, 1995). Pour ces premières patientes décrites et porteuses de la mutation récurrente Ala189Val de *FSHR,* il a été noté à l'histologie une croissance folliculaire de quelques follicules jusqu'au stade antral (Aittomäki *et al.*, 1995). Les études fonctionnelles ont montré que cette première mutation récurrente Ala189Val était responsable d'une perte de fonction partielle de FSHR (Rannikko *et al.*, 2002). D'autres patientes avec inactivations partielles et croissance folliculaire jusqu'au stade antral ont été décrites (Beau *et al.*, 1998; Touraine *et al.*, 1999). Par la suite, une patiente présentant une IOP avec une aménorrhée primaire avec absence de développement pubertaire en rapport avec une mutation perte de fonction complète de FSHR (Pro519Thr) a été décrite (Meduri *et al.*, 2003). L'histologie ovarienne a retrouvé un ovaire de type prépubère avec un blocage complet de la croissance folliculaire après le stade du follicule primaire (Meduri *et al.*, 2003). Ceci a montré que la FSH agit après le stade de follicule primaire (Meduri *et al.*, 2003). Remarquablement, il y avait une densité accrue de petits follicules de prés de 40 fois par rapport à une femme du même âge (Figure 7) (Meduri *et al.*, 2003). Il existe donc une corrélation entre la sévérité de la perte de fonction de FSHR et le phénotype des patientes mais avec toujours une

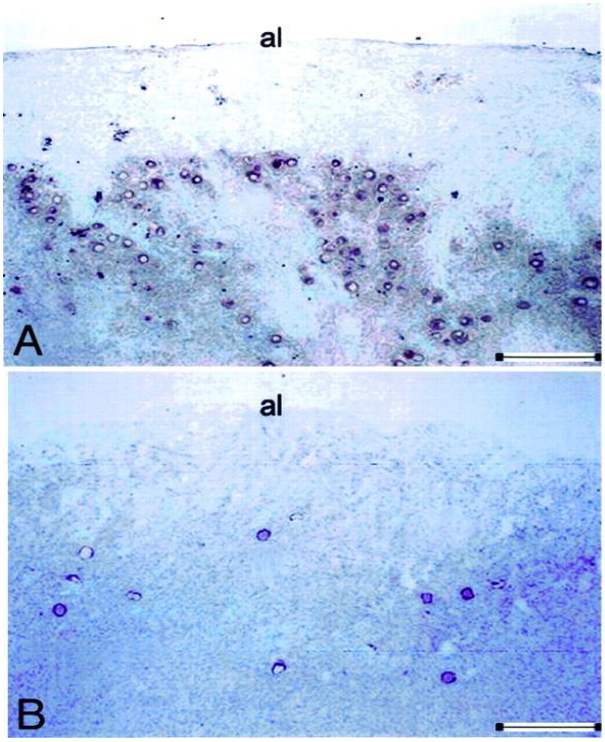


Figure 7 : Coupe histologique de l'ovaire d'une patiente avec mutation biallélique de FSHR (A) et d'une patiente controle (B) (Meduri et al., 2003)

réserve ovarienne préservée (Huhtaniemi *et al.*, 2018a).En raison de l'existence de follicules dans les ovaires, une maturation *in vitro* peut être obtenue et la fertilité restaurée (Grynberg *et al.*, 2013). Quelques études suggèrent que certains polymorphismes du récepteur de la FSH notamment le polymorphisme rs6166 (c.2039A>G, p.Asn680Ser) peuvent interférer avec la réponse à la stimulation des patientes au protocole de FIV (Polyzos *et al.*, 2021). Un consensus d'expert a suggéré l'utilisation de doses plus élevés de FSH recombinante chez les porteuses du génotype homozygote Ser/Ser du polymorphisme rs6166 (Conforti *et al.*, 2021).

NOBOX : Des mutations hétérozygotes du facteur de transcription NOBOX ont été rapportées chez des femmes présentant une IOP sporadique (Bouilly *et al.*, 2011, 2016). Contrairement au modèle de souris knock-out, qui présente une perte postnatale accélérée d'ovocytes (Rajkovic *et al.*, 2004), les patientes porteuses d'une mutation *NOBOX* peuvent avoir une aménorrhée primaire ou secondaire avec des follicules détectés par histologie dans les ovaires à l'âge adulte (Bouilly *et al.*, 2011; Huhtaniemi *et al.*, 2018a).Certaines publications avaient estimées jusqu'à 6.2% la prévalence des mutations de NOBOX dans l'IOP (Bouilly *et al.*, 2011).

BMP15 : La première implication de *BMP15* dans l'IOP a été rapportée en 2004 en étudiant une patiente italienne présentant une IOP avec une aménorrhée primaire (Di Pasquale *et al.*, 2004). Une mutation faux-sens p.Trp235Cys de transmission paternelle, responsable d'un effet dominant négatif *in vitro*, a été identifiée (Di Pasquale *et al.*, 2004). Depuis, plusieurs variants, majoritairement hétérozygotes, ont été rapportés chez des patientes avec des ovaires atrophiques sans follicule à l'échographie, ce qui a été interprété comme une déplétion prématurée de la réserve ovarienne (Persani *et al.*, 2014). Les études fonctionnelles ont suggéré que ces variants sont à l'origine soit d'un effet dominant négatif soit d'une haploinsuffisance

(Persani *et al.*, 2014). Cependant une famille avec deux sœurs présentant une IOP rapportée en 2017 a remis en question l'haploinsuffisance de *BMP15* dans l'IOP (Mayer *et al.*, 2017). En effet, ces deux sœurs sont porteuses de deux variants tronquants à l'état hétérozygote composite de *BMP15*. Malgré des ovaires atrophiques, l'AMH était initialement détectable chez les deux sœurs de cette famille ce qui est en faveur d'une réserve ovarienne conservée (Mayer *et al.*, 2017). Cinq ans plus tard, cependant, l'AMH n'a pas été détectée chez les deux sœurs, probablement en raison de l'épuisement du pool de FP. Ceci montre la rapidité de la dégradation du stock folliculaire initial chez les patientes avec IOP et la nécessité d'une préservation urgente de la fertilité. La mère de ces deux sœurs, porteuse à l'état hétérozygote de l'un des deux variants tronquants, a conçu normalement et a eu trois enfants (Mayer *et al.*, 2017). Ainsi, il semble que l'haploinsuffisance de *BMP15* n'est pas suffisante pour être à l'origine d'une IOP (Mayer *et al.*, 2017). Ceci a été confirmé récemment par une autre équipe (Rossetti *et al.*, 2020).

En l'absence de grande cohorte de réplication, l'implication et l'héritabilité de ces gènes étaient donc discutables ce d'autant plus qu'il n'existe parfois une absence de concordance entre le modèle murin et l'humain pour les premiers gènes décrits chez l'homme. Ceci a conduit à une surestimation de l'implication et la pathogénicité des variants de ces gènes dans l'IOP (jusqu'à 10-15%) (Qin *et al.*, 2015b).

L'avènement du séquençage nouvelle génération *(NGS : Next Generation Sequencing)* ces dix dernières années, notamment le séquençage de l'exome complet (*WES : Whole exome Sequencing*) a permis l'identification de nombreux gènes responsables d'IOP avec en particulier le rôle majeur des gènes de méiose et de la réparation de l'ADN (Huhtaniemi *et al.*, 2018a; Veitia, 2020). Cependant la quasi-totalité des gènes ont été identifiés dans des familles ou des patientes isolées

majoritairement consanguines. La première application de l'exome dans le cadre de l'IOP a permis d'identifier le gène *PSMC3IP*, codant une protéine impliquée dans la recombinaison homologue et la réparation d'ADN dans une grande famille consanguine d'origine palestinienne (Zangen *et al.*, 2011). En France, c'est l'équipe du Pr Reiner Veitia qui a rapporté la première application de l'exome pour identifier *STAG3* comme étant le premier gène de méiose à l'origine d'une IOP non syndromique en étudiant une grande famille consanguine d'origine palestinienne (Caburet *et al.*, 2014). Par la suite, des observations similaires ont rapporté d'autres gènes, identifiés quasiment tous, dans des familles consanguines ou des patientes isolées uniquement dans des gènes de méiose et de la réparation d'ADN. Ceci a été probablement l'origine d'une surestimation du rôle de ces gènes dans l'IOP et de la proposition qu'il s'agissait de la famille la plus importante sans toutefois l'étude de grande cohorte d'IOP pour confirmer ce point.

PRESENTATION DES TRAVAUX

3 PRESENTATION DES TRAVAUX

3.1 IMPLICATION DE LA VOIE DE REPARATION DE L'ADN DE FANCONI DANS L'IOP

Article 1: Homozygous hypomorphic BRCA2 variant in primary ovarian insufficiency without cancer or Fanconi anaemia trait

Sandrine Caburet *, Abdelkader Heddar *, Elodie Dardillac*, Héléne Creux, Marie Lambert, Sébastien Messiaen, Sophie Tourpin, Gabriel Livera, Bernard S Lopez, Micheline Misrahi

J Med Genet 2020 Jun 1;jmedgenet-2019-106672. doi: 10.1136/jmedgenet-2019-106672.

* Co-first authors

En préparation: Essential role of BRCA1 in ovarian function revealed by Germline Compound null Mutations in patients with Primary Ovarian Insufficiency.

Abdelkader Heddar, Maud Marchand, Anne Helbling-Leclerc, Léa Guerrini-Rousseau, Nathalie Auger, Laurence Brugieres, Michel Polak, Jean Soulier, Bernard S Lopez, Filippo Rosselli, Micheline Misrahi. Essential role of BRCA1 in ovarian function revealed by Germline Compound Heterozygous null Mutations in patients with Primary Ovarian insufficiency.

Communication affichée Assise de Génétique 2022.

3.1.1 Homozygous hypomorphic BRCA2 variant in primary ovarian insufficiency without cancer or Fanconi anaemia trait.

J Med Genet 2020 Jun 1. doi: 10.1136/jmedgenet-2019-106672.

BRCA2 (*FANCD1*) est un gène qui code une protéine qui fait partie du complexe de la voie Fanconi avec un rôle majeur dans la recombinaison homologue et donc la réparation des cassures d'ADN double brin (Figures 5 et 8) (Moynahan *et al.*, 2001). Chez les mammifères, suite à une cassure double brin, BRCA2 est recruté au niveau du site de cassure et se lie à l'ADN endommagé pour charger RAD51 (FANCR) (Figure 8). Ce dernier favorise alors la recherche d'homologie de l'ADN sur le chromosome homologue et par la suite la réparation d'ADN(Figure 8) (Lambert and Lopez, 2000; Moynahan *et al.*, 2001). Par conséquent, les cellules défectueuses en BRCA2 ou RAD51 sont défectueuses en recombinaison homologue (Lambert and Lopez, 2000; Moynahan *et al.*, 2001; Hoeijmakers, 2009).

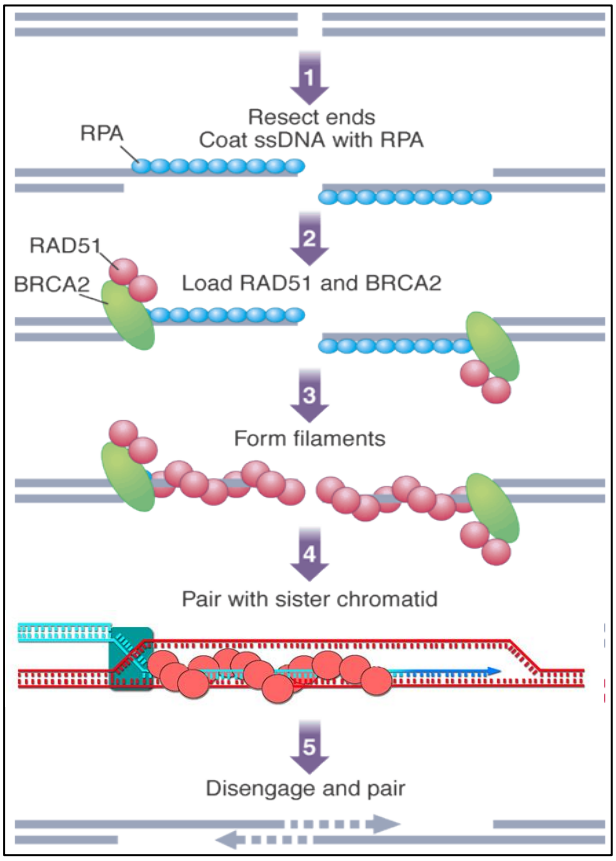


Figure 8 : Mecanisme d'action de BRCA2 dans la recombinaison Homologue.

Alors que le rôle de ce gène au niveau des cellules somatiques a été largement étudié chez l'homme et les modèles murins, son rôle au niveau des cellules germinales est moins étudié (Li and Engebrecht, 2021). En effet, les mutations hétérozygotes de

BRCA2 augmentent la susceptibilité aux cancers du sein et de l'ovaire faisant de *BRCA2* l'un des gènes majeurs de prédisposition génétique au cancer du sein et de l'ovaire, tandis que les défauts bi-alléliques de *BRCA2* sont responsables de l'AF (Auerbach, 2009; Hoeijmakers, 2009). Dans ce syndrome, le cancer se développe au cours de la première décennie de la vie et la mort survient souvent avant la puberté (Meyer *et al.*, 2014). Les phénotypes sévères de l'AF chez l'homme par inactivation bi-allélique de *BRCA2* et la létalité embryonnaire précoce dans des modèles animaux ont rendu l'étude de l'impact de BRCA2 sur la méiose difficile à étudier ou hypothétique (Tsuzuki *et al.*, 1996; Ludwig *et al.*, 1997; Sharan *et al.*, 1997). Récemment, il a été rapporté des patientes adultes atteintes d'AF avec une dysgénésie ovarienne et porteuses de mutations bi-alléliques de *BRCA2* (Weinberg-Shukron *et al.*, 2018; Qin *et al.*, 2019; Turchetti *et al.*, 2019).

Contrairement à ce qui rapporté à ce jour, nous décrivons ici une patiente adulte âgée de 41 ans au moment de la publication de notre article et présentant une IOP isolée sans cancer ni signe d'AF. L' étude de l'exome a révélé qu'elle etait porteuse d'une variant faux-sens homozygote pathogène de *BRCA2*. Il s'agit d'une patiente issue d'une famille consanguine d'origine turque qui a présenté une aménorrhée précoce à l'âge de 13 ans mais avec un développement pubertaire normal. Plusieurs dosages hormonaux ont confirmé le diagnostic d'IOP avec à l'échographie des ovaires de petites tailles sans follicule. Il n'y a pas d'anomalie hématologique décrite et le bilan auto-immun est revenu normal. Notamment, il n'existe pas de microcéphalie, ni aucune anomalie de la pigmentation de la peau ou du développement du squelette ou de dysmorphie. Après deux procédures de don d'ovocytes, elle a eu deux grossesses avec quatre enfants en bonne santé. Au niveau familial, le père de 71 ans, gros fumeur,

a eu un cancer du poumon à l'âge de 67 ans, un oncle paternel a développé un cancer colorectal à l'âge de 74 ans. Six autres oncles et tantes paternels et maternels, âgés de 61 à 75 ans, n'ont aucun antécédent de cancer ou d'infertilité.

L'étude de l'exome *en solo* de cette patiente nous a permis de mettre en évidence un variant homozygote rare situé dans l'exon 20 de *BRCA2* (rs80359104) : NM_000059.3 : c.8524C>T (p.R2842C). Ce variant modifie un acide aminé strictement conservé au cours de l'évolution situé au niveau du site de liaison de l'ADN. Ce domaine C-terminal de la protéine est essentiel pour une liaison appropriée de *BRCA2* à l'ADN simple brin (Yang *et al.*, 2002).

Pour établir un lien de causalité entre cette variation homozygote de *BRCA2* et le phénotype de la patiente, nous avons tout d'abord étudié l'expression de BRCA2 au niveau des ovaires fœtaux humains. Nous avons pu rapporter pour la première fois que l'expression de BRCA2 est prédominante à 11 semaines après la fécondation, lorsque les ovocytes entrent et progressent au niveau de la prophase de la méiose I. Ces résultats montrent que BRCA2 est exprimé au niveau des ovocytes fœtaux humains lors de la réparation méiotique des cassures double brin. Par la suite nous avons développé une série de tests fonctionnels *in vitro* pour démontrer l'impact de cette variation sur la fonction de BRCA2 :

1. Cassures chromosomiques en présence d'un agent intercalant de l'ADN, la mitomycine (MMC). En effet, la fragilité chromosomique en présence d'un agent intercalant est un bon reflet de la recombinaison homologue et très en faveur d'une altération de la voie de l'AF (Oostra *et al.*, 2012). Les cellules d'un patient atteint d'une AF présentent des cassures chromosomiques et des images radiales parfois difficiles à compter car tellement nombreuses en présence de MMC. Ce signe est très

caractéristique voire pathognomonique de l'AF (Auerbach, 2009; Oostra *et al.*, 2012). À 300 nM de MMC, toutes les cellules déficitaires en FANCD1 présentaient des cassures, comme prévu, tandis que les cellules de la patiente présentaient une légère augmentation des cassures chromosomiques, par rapport aux cellules de la mère, hétérozygote pour le variant de *BRCA2*, et les cellules d'un témoin WT. En effet, le nombre de cassures dans les cellules de la patiente n'était que 10 fois supérieur à celui des cellules WT contre 41 fois dans les cellules FANCD1. Les cellules de la patiente présentaient donc une fragilité intermédiaire entre celle observée chez un contrôle WT et ceux de l'AF.

2. Réduction du taux de prolifération des fibroblastes primaires de la patiente : Confirmant le phénotype intermédiaire obtenu avec l'étude de la fragilité chromosomique en présence de MMC, le taux de prolifération des cellules de la patiente était intermédiaire entre celui des cellules WT et celui des cellules déficitaires en FANCD1 (issues d'une patiente atteinte d'une AF par mutation bi-allélique de BRCA2).

3. Réduction de l'efficacité de la recombinaison homologue : en collaboration avec le Dr Bernard S Lopez, de l'institut Cochin, nous avons développé un test fonctionnel pour quantifier la recombinaison homologue du variant identifié chez la patiente. Très brièvement, nous avons utilisé la lignée cellulaire RG37 (Dumay *et al.*, 2006), une lignée de fibroblastes humains SV40 immortalisés portant le substrat fluorescent avec la GFP (Pierce *et al.*, 1999) pour suivre et quantifier le clivage de l'ADN par une enzyme la méganucléase I-SceI. Nous avons inactivé par siRNA spécifique le BRCA2 endogène puis nous avons complémenté soit par le BRCA2 WT ou muté (R2842C). Alors que le BRCA2 WT a permis de restaurer totalement la

recombinaison homologue (mesuré par l'intensité de la GFP), le mutant R2842C-BRCA2, n'a restauré que partiellement cette activité qu'on estime à 67 ± 6 % par rapport au WT-BRCA2. Le variant R2842C de BRCA2 garde donc une activité résiduelle de l'ordre de 33%. D'une manière intéressante et après la soumission de notre travail, une équipe néerlandaise a publié un travail similaire de quantification de la recombinaison homologue d'une dizaine de variants de BRCA2 dont le R2842C identifié chez notre patiente (Mesman *et al.*, 2019). L'activité résiduelle du variant R2842C,dans les céllules murines toutefois, était de 31% ce qui est très proche de nos résultats (Mesman *et al.*, 2019).

4.Diminution de la formation des foci RAD51 en présence de doses croissantes de radiation ionisante dans les fibroblastes de la patiente. Etant donné que le rôle principal de BRCA2 est le chargement de RAD51 au niveau des sites d'ADN endommagé en réponse un stimulus extérieur (ici les radiations ionisantes à dose progressive) (Figure 7) (Lambert and Lopez, 2000; Moynahan *et al.*, 2001), nous avons quantifié par fluorescence également, la formation des foci RAD51, qui sont considérés comme des sites d'initiation de la recombinaison homologue. En concordance avec les résultats précédents, les cellules de la patiente ont un nombre de foci RAD51 inférieur par rapport à un témoin mais quantifiable par rapport aux cellules déficientes en FANCD1. De plus, alors qu'il y a un déficit complet dans l'assemblage des foci RAD51 pour les cellules FANCD1 quelle que soit la dose d'irradiation, les cellules de la patiente présentent une sensibilité dose-dépendante. En effet, ces cellules sont capables de traiter de faibles niveaux de dommages de l'ADN (nombre de foci RAD51 similaire avec le WT à petite dose d'irradiation), mais ne parvenant pas à assembler les foci RAD51 face à des niveaux élevés de dommages

à l'ADN (dose élevée d'irradiation). L'activité de recombinaison homologue résiduelle du mutant R2842C-BRCA2 pourrait expliquer l'absence de pathologie somatique *in vivo* dans les conditions basales. Les cellules somatiques sont rarement confrontées spontanément à des niveaux élevés de cassures simultanées alors qu'en revanche, la recombinaison méiotique dans les cellules germinales est initiée par des centaines de cassures nécessitant des centaines de recombinaisons homologues pour produire des gamètes haploïdes fonctionnels (Zhang *et al.*, 2019a). Dans notre test fonctionnel, l'assemblage des foyers RAD51 par le BRCA2 muté a été significativement diminué à des doses élevées d'irradiation (> 5 Gy) générant un grand nombre de cassures double brin (Ruiz de Almodóvar *et al.*, 1994). Par conséquent, on pourrait s'attendre à ce que la mutation R2842C-BRCA2 affecte la réparation d'un nombre élevé de cassures double brin méiotiques.

Notre observation décrit la première patiente adulte avec une IOP complètement isolée due à une mutation bi-allélique de BRCA2, sans cancer ni signe de l'anémie de Fanconi. Nous démontrons en utilisant divers tests fonctionnels *in vitro* à partir des cellules de la patiente que le variant R2842C-BRCA2 est hypomorphe et conserve une fonction résiduelle de recombinaison homologue de l'ordre de 33% par rapport à un contrôle WT. Cette activité résiduelle pourrait expliquer le tableau clinique de la patiente et confirme une différence de sensibilité entre les cellules méiotiques et les cellules mitotiques face aux cassures de l'ADN. Cette activité résiduelle est suffisante pour les cellules somatiques et donc pourrait expliquer l'absence de manifestation somatique notamment de cancer ou de signe de l'AF à l'âge de 41 ans chez cette patiente mais également dans sa famille. Elle est cependant insuffisante pour la recombinaison homologue au niveau méiotique et donc à l'origine de l'IOP de

la patiente. Comme BRCA2 est un gène majeur de susceptibilité au cancer (Walsh *et al.*, 2011), nos découvertes ont un impact sur le conseil génétique, l'information pré-test données aux patientes avant l'analyse d'exome ou de panel NGS dans le cadre d'une IOP mais également dans la prise en charge des patientes atteints d'IOP et de leurs proches. Paradoxalement, un tel surrisque de cancer associé à des mutations de BRCA2 n'a pas été observé dans la famille de notre patiente. Ceci peut être expliqué par le caractère hypomorphe du variant de BRCA2 mais également par la pénétrance variable des mutations de *BRCA2.* Cependant, la nature hypomorphe d'un variant BRCA2 ne signifie pas qu'il n'y a pas de risque de cancer. En effet, dans une étude cas-témoin utilisant les données de séquençage de près de 50 000 cas avec cancer du sein (48 159 cas et 48 231 témoins), il a été rapporté que les variants faux-sens hypomorphes de BRCA2 (avec une activité résiduelle >30% et <50%) sont associés à un risque modéré de cancer du sein et nécessitent donc un suivi approprié à long terme (Shimelis *et al.*, 2017). Il est donc raisonnable de proposer que la prise en charge clinique des patientes avec IOP et des variants pathogène ou probablement pathogène de BRCA2, y compris hypomorphes avec un effet fonctionnel démontré, comme chez notre patiente, inclue la possibilité d'une chirurgie prophylactique et la surveillance par echographie mammaire et de discuter un diagnostic présymptomatique pour les autres membres de la famille. En particulier, selon les données de la littérature actuelle, les patientes avec une IOP secondaire à des mutations bi-alléliques de BRCA2 ont de petits ovaires non fonctionnels sans follicule.

ORIGINAL RESEARCH

Homozygous hypomorphic *BRCA2* variant in primary ovarian insufficiency without cancer or Fanconi anaemia trait

Sandrine Caburet ,[1] Abdelkader Heddar,[2] Elodie Dardillac ,[3] Héléne Creux,[4] Marie Lambert,[4] Sébastien Messiaen,[5] Sophie Tourpin,[5] Gabriel Livera,[5] Bernard S Lopez,[3] Micheline Misrahi [2]

ABSTRACT

Background Primary ovarian insufficiency (POI) affects 1% of women under 40 years and is a public health problem. The genetic causes of POI are highly heterogeneous with isolated or syndromic forms. Recently, variants in genes involved in DNA repair have been shown to cause POI. Notably, syndromic POI with Fanconi anaemia (FA) traits related to biallelic *BRCA2* truncated variants has been reported. Here, we report a novel phenotype of isolated POI with *a BRCA2* variant in a consanguineous Turkish family.

Methods Exome sequencing (ES) was performed in the patient. We also performed functional studies, including a homologous recombination (HR) test, cell proliferation, radiation-induced RAD51 foci formation assays and chromosome breakage studies in primary and lymphoblastoid immortalised cells. The expression of *BRCA2* in human foetal ovaries was studied.

Results ES identified a homozygous missense c.8524C>T/p.R2842C-*BRCA2* variant. BRCA2 defects induce cancer predisposition and FA. Remarkably, neither the patient nor her family exhibited somatic pathologies. The patient's cells showed intermediate levels of chromosomal breaks, cell proliferation and radiation-induced RAD51 foci formation compared with controls and FA cells. R2842C-BRCA2 only partially complemented HR efficiency compared with wild type-BRCA2. BRCA2 is expressed in human foetal ovaries in pachytene stage oocytes, when meiotic HR occurs.

Conclusion We describe the functional assessment of a homozygous hypomorphic *BRCA2* variant in a patient with POI without cancer or FA trait. Our findings extend the phenotype of BRCA2 biallelic alterations to fully isolated POI. This study has a major impact on the management and genetic counselling of patients with POI.

INTRODUCTION

Primary ovarian insufficiency (POI) is a public health issue affecting ~1% of women under 40 years and is clinically heterogeneous with isolated or syndromic forms.[1] Most cases are idiopathic, but an increasing number of genetic causes has been recently identified, especially variants in genes involved in DNA repair and recombination.[2–4]

DNA repair and recombination are essential for genome stability maintenance. Consistently, defects in the pathways ensuring faithful transmission of genetic material result in genome instability associated with developmental abnormalities and cancer predisposition.[5] Homologous recombination (HR), an evolutionary conserved process essential to genome stability and cell viability, plays crucial roles in DNA double-strand break (DSB) repair in somatic and meiotic cells.

In mammals, BRCA2 binds to damaged DNA and loads the pivotal HR RAD51 recombinase, which then promotes DNA homology search. Therefore, cells defective in BRCA2 or RAD51 are defective in mitotic HR.[6 7] The role of BRCA2 in RAD51 loading in mitotic HR makes it a strong candidate for an involvement in meiotic HR, but this remains to be formally established. Indeed, the severe phenotypes of biallelic inactivation of BRCA2 in human and the early embryonic lethality resulting from germ-line inactivation of this essential gene in animal models hampered meiosis analysis and compromised the study of the putative functions of BRCA2 in gametogenesis.[8–10] However, these data underline the strong and pleiotropic consequences of *BRCA2* invalidation.

Heterozygous *BRCA2 or PALB2 (FANCN)* variants increase susceptibility to breast and ovarian cancers, whereas severe biallelic defects in *RAD51 (FANCR)*, *PALB2* or *BRCA2 (FANCD1)* lead to Fanconi anaemia (FA) syndrome.[11 12] In particular, *FANCD1* syndrome associates developmental defects, genetic instability, bone marrow failure and cancer predisposition, with cancer developing in the first decade of life, and death before puberty.[13] Recently, older patients with XX ovarian dysgenesis were reported to carry compound heterozygous BRCA2 pathogenic or likely pathogenic variants, but the associated clinical phenotypes in the patients and/or relatives, ranging from cancer to the characteristic severe response to mitomycin C (MMC) in chromosomal breakage tests, argue in favour of mild forms of BRCA2-associated FA.[14–16]

In contrast to those patients, we describe here an adult patient carrying a homozygous missense variant of *BRCA2*, presenting with only isolated POI, without cancer or signs of FA in the patient or her family. We demonstrate that the mutated R2842C-BRCA2 retains a lower, but significant, residual function when compared with wild-type (WT)-BRCA2. Consistently, the patient's cells

► Additional material is published online only. To view, please visit the journal online (http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106672).

[1]Institut Jacques Monod, Université de Paris, Paris, Île-de-France, France
[2]Faculte de Medecine, Universite Paris Saclay, Hopital Bicêtre APHP, Le Kremlin-Bicetre, France
[3]Institut Cochin, INSERM U1016, UMR 8104 CNRS, Université de Paris, Paris, Île-de-France, France
[4]Service de Gynécologie et Médecine de la Reproduction, CHU de Bordeaux, Bordeaux, Aquitaine, France
[5]UMR Stabilité Génétique, Cellules Souches et Radiations, Université Paris-Saclay, Fontenay aux Roses, Île-de-France, France

Correspondence to
Professor Micheline Misrahi, Université Paris Saclay Faculté de Medecine, Hôpital Bicêtre APHP, Le Kremlin-Bicetre, France;
micheline.misrahi@aphp.fr
Dr Bernard S Lopez;
bernard.lopez@inserm.fr

SC, AH and ED are joint first authors.

Received 5 November 2019
Revised 8 April 2020
Accepted 12 April 2020

Check for updates

© Author(s) (or their employer(s)) 2020. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

To cite: Caburet S, Heddar A, Dardillac E, *et al*. *J Med Genet* Epub ahead of print: [please include Day Month Year]. doi:10.1136/jmedgenet-2019-106672

J Med Genet: first published as 10.1136/jmedgenet-2019-106672 on 1 June 2020. Downloaded from http://jmg.bmj.com/ on June 2, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

exhibit intermediate levels in chromosomal breaks, cell proliferation and ionising radiation-induced RAD51 foci formation when compared with controls, a patient with FANCD1's or the heterozygous mother's cells. This residual HR in somatic cells could explain the absence of developmental defects. Our data extend the phenotype of biallelic variants of BRCA2 to isolated POI. As *BRCA2* is a major cancer susceptibility gene, our findings will have a strong impact on the genetic counselling and management of patients with POI and their relatives.

MATERIAL AND METHODS

Exome sequencing (ES) and bioinformatics analysis

Genomic DNA was extracted from blood samples by standard protocols. ES, reads quality check and mapping were performed by Beckman Coulter Genomics (Danvers, USA). Exon capture was performed using the hsV5UTR target enrichment kit. Mapping was performed on the GRCh37.p13 reference genome using the Burrows-Wheeler Alignment tool V.0.6.1-r104 with default parameters, and samtools 'Rmdup' was used to remove duplicates. Prior to variant calling, reads were realigned around known or suspected indels by the GATK Realigner commands. The samtools V.2.0 'mpileup' command and the bcftools multiallelic calling model were used for variant calling. Variants were annotated by SnpEff, Variant Effect Predictor and dbNSFP 3.5a. Minor allele frequencies were manually verified using ExAC (http://exac.broadinstitute.org/), Gnomad (https://gnomad.broadinstitute.org/) and Kaviar (http://db.systemsbiology.net/kaviar/) databases.

Chromosome breakage studies

Chromosome breakage studies were performed in Epstein-Barr Virus (EBV)-immortalised lymphoblastoid cell lines derived from the patient, her mother, an FA patient (FANCD1) and a healthy woman as control. They were studied at the Gustave Roussy Institute (Villejuif, France), following a standard in-house protocol. EBV-immortalised cells were cultured under standard conditions for karyotyping. To test for hypersensitivity to DNA cross-linking agents, DNA damage was induced using MMC (Sigma) added for 48 hours. For each sample, three conditions were tested: without MMC to analyse spontaneous damages, and with MMC of 300 and 1000 nM. Chromosome breakages were scored by an experienced cytogeneticist on at least 20 metaphases.

Cell transfection and HR efficiency test

The HR efficiency was assessed in the RG37 cell line, derived from SV40-transformed GM639 human fibroblasts in which we stably integrated the pDR-GFP gene conversion reporter.[17 18] RG37 was cultured in DMEM supplemented with 10% foetal calf serum and 2 mM glutamine and was incubated at 37°C with 5% CO_2. For the HR efficiency test, the I-SceI meganuclease was expressed by transient transfection of the pCMV-HA-I-SceI expression plasmid[19] with Jet-PEI according to the manufacturer's instructions (Polyplus Transfection), and cells were incubated for 48 hours. Cells were collected in PBS and 50 mM EDTA, pelleted and fixed with 2% paraformaldehyde for 20 min. The percentage of GFP-expressing cells was scored by FACS analysis using a BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences).

For silencing experiments, 20 000 cells were seeded 1 day before transfection with siRNAs using INTERFERin, following the manufacturer's instructions (Polyplus Transfection) with 20 nM of one of the following siRNAs: control (5′-AUGAACGUGAAUUGCUCAA-3′) and BRCA2-3 (5′-GCUUCAGUUGCAUAUCUUA-3′). The BRCA2 siRNA targets the 3′UTR of endogenous BRCA2 messenger RNA (mRNA). All siRNAs were synthesised by Eurofins (France). Forty-eight hours later, the cells were transfected with the pCMV-HA-I-SceI expression plasmid. At least three independent experiments were performed, and HA-I-SceI expression and silencing efficiency were verified by western blot as described further.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism V.3.0 (GraphPad Software).

Additional material and methods and additional results are provided in the online supplementary appendix.

RESULTS

Case report

The proposita was born to consanguineous Turkish parents (figure 1A). At the age of 13 years, she had two vaginal bleeds followed by primo-secondary amenorrhoea. She had normal pilosity, breast development and external genitalia. Several hormonal assays confirmed POI, and pelvic ultrasonographical studies showed small ovaries without or with very few follicles (table 1).

Blood counts and liver and thyroid balances were normal. Thyroid autoantibodies were undetectable. Hormonal replacement therapy (HRT) was initiated during her teenage years but was poorly observed, and stopped in early adulthood when she started thinking about getting pregnant. Bone densitometry at the age of 30 showed osteopaenia (T score=−2.3) related to poor adherence to HRT. She is presently 41 years old, displays normal blood assays and has no other clinical signs. The karyotype was 46, XX, and FMR1 premutation screening was negative. After two egg-donation procedures, she had two pregnancies with four healthy children.

The patient and family members have normal stature, normal head circumference and no abnormality in skin pigmentation, skeletal development or dysmorphia (table 1). There was no familial history of infertility or other diseases. The mother married at the age of 15 and had two pregnancies at 18 (a boy) and 22 (the proposita) years. This is in line with a delayed conception followed by secondary amenorrhoea at the age of 33 years, not investigated in Turkey. She is obese with a body mass index of 38. In order to rule out other genetic causes that could explain her subfertility, we performed a targeted next-generation sequencing (see supplementary information). The brother had one healthy son (17 years old) and three healthy daughters aged 15, 13 (both with normal puberty) and 8 years old, respectively. The 71-year-old father, a heavy smoker, had lung cancer at the age of 67 years, treated by radiotherapy and chemotherapy. A paternal uncle developed colorectal cancer at the age of 74 years and died a few months later. Six other paternal and maternal uncles and aunts, aged 61–75 years, had no history of cancer or infertility.

ES identified a homozygous missense variant in the DNA-binding domain of *BRCA2*

The patient was studied by ES. Familial consanguinity suggested an autosomal recessive inheritance pattern. The variants were therefore filtered on the basis of their homozygosity in the patient, their absence in unrelated fertile in-house controls and a minor allele frequency (MAF) below 0.01 in all available databases. Further filtering on available functional data for a possible role in fertility revealed the missense variant rs80359104, NM_000059.3: c.8524C>T (p.R2842C), located in exon 20 of *BRCA2* (figure 1B and online supplementary table s1 and s2). The variant and its familial segregation were confirmed by

J Med Genet: first published as 10.1136/jmedgenet-2019-106672 on 1 June 2020. Downloaded from http://jmg.bmj.com/ on June 2, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

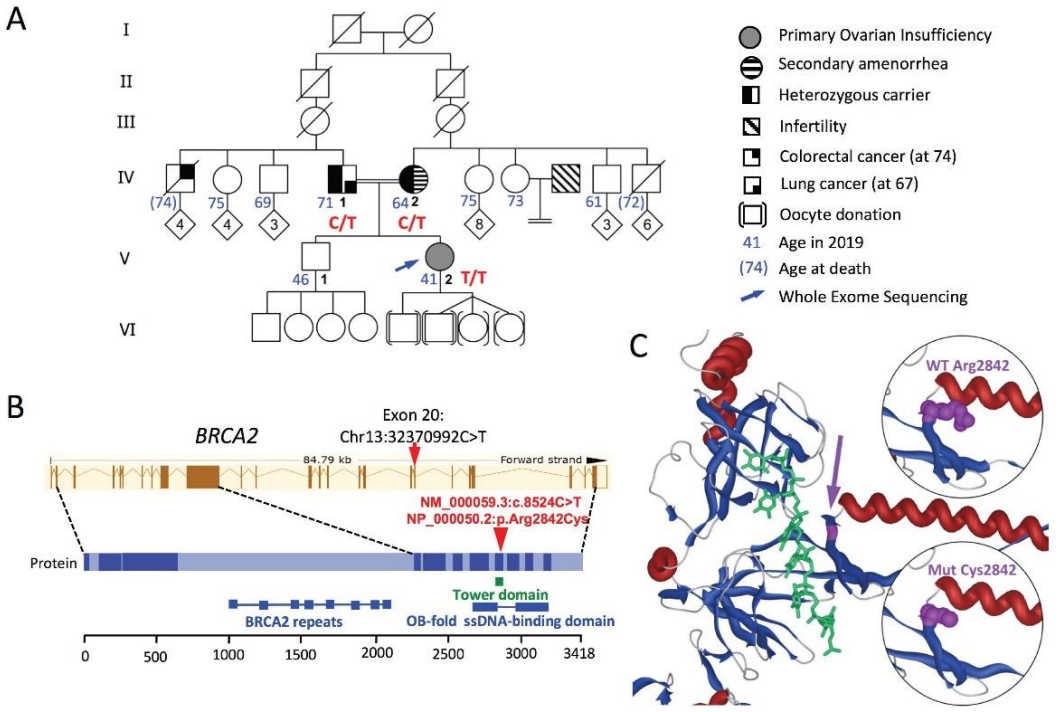


Figure 1 Clinical, biological studies and molecular analysis of the Turkish family. (A) Pedigree of the Turkish family. Double lines indicate consanguineous union. The proband (blue arrow) was analysed by ES. The genotypes for the *BRCA2* mutated codon are indicated in red. (B) Position of the variant in *BRCA2* gene and protein. The structure of the normal protein for the longest isoform of 3418 residues is shown below the genomic structure with the coding exons as coloured bars (Ensembl, reference transcript ENST00000544455.5). The variant (red arrows) lies at the very end of exon 20, which encodes 48 amino acids (A) encompassing the tower domain at the centre of the OB-fold ssDNA-binding domain (oligonucleotide/oligosaccharide-binding single-strand DNA-binding domain). (C) Partial view of the 3D model of the BRCA2 C-terminal domain (alpha-helices in red, beta-sheets in blue). The mutated residue (purple) is located near the ssDNA (green), at the base of the tower domain, that forms a stem of two long alpha-helices and a helix-turn-helix motif, similar to the DNA-binding domains of recombinases and homeodomain transcription factors. Inserts: difference between the occupancy of the lateral chain of WT (top) and mutated (bottom) residues at this position. ES, exome sequencing; ssDNA; single-stranded DNA; WT, wild type.

Sanger sequencing, which also allowed exclusion of mosaicism in the patient's blood cells (online supplementary figure s1). The variant is very rare and presents only at the heterozygous state in 3 out of 138 342 individuals without known phenotype (MAF 1.10^{-5}) in the non-cancer GnomAD subset. It is absent in the Greater Middle East Variome database dedicated to Middle Eastern populations. It is predicted to be pathogenic by 16 of 17 predictive software (online supplementary table s3 and s4).

The variant changes a strictly conserved amino acid (aa) at the base of the tower part of the BRCA2 DNA-binding domain, in close proximity to the groove that binds single-stranded DNA (ssDNA) (figure 1C and online supplementary figure s2). This C-terminal domain is essential for appropriate binding of BRCA2 to ssDNA.[20]

BRCA2 loads recombinases on ssDNA: RAD51 in mitotic cells, RAD51 and the meiotic DMC1 in germ cells, indicating a crucial role for BRCA2 in mitotic and meiotic HR.[21] Cells defective in RAD51 or BRCA2 are defective in mitotic HR,[6 7] and in mouse, germ cell-specific *BRCA2* deletions lead to meiotic impairment and infertility.[22 23] Therefore, we considered *R2842C-BRCA2* as a very likely causal variant for isolated POI in our patient, although she does not present FA traits. Hence, we investigated the expression of *BRCA2* in human oocytes and the functional impact of the BRCA2 variant on HR in human cells.

BRCA2 is expressed during meiotic prophase I in human foetal ovaries

In order to support a possible role for BRCA2 in female meiotic HR that would explain the patient's infertility, we verified its expression and location in human foetal ovaries. Indeed, *Brca2* mRNA expression was reported in murine oocytes,[23] and the BRCA2 protein was described to form recombination nodule-like foci along chromosome axes in human spermatocytes,[24] but its expression during human female meiosis remained undocumented. Using quantitative reverse transcription PCR on RNA libraries prepared from human ovarian samples at various foetal stages, we detected a predominant expression of *BRCA2* mRNA after 11 weeks postfertilisation, when oocytes enter and progress through meiotic prophase I (figure 2A). Immunostaining of human foetal ovarian sections showed that BRCA2 protein was detected mostly in pachytene stage oocytes (figure 2B). BRCA2

J Med Genet: first published as 10.1136/jmedgenet-2019-106672 on 1 June 2020. Downloaded from http://jmg.bmj.com/ on June 2, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

Table 1 Clinical, biological and ultrasonographical studies of the proband and relatives

Case	Menstrual cycles	Age at evaluation (years)	BMI (height (cm)/ weight (kg))	HC cm (SD)	R/L Ovarian surface (mm) Volume (mm^3)	R/L Follicle number	FSH IU/L	LH IU/L	E2 nmol/L	AMH ng/mL	InhB ng/L	T nmol/L	PRL ng/mL	TSH mU/L
Proposita	Primo-secondary amenorrhoea (13 years)	30	23 (156/55)	55.5 (0)	12/17 0.9/0.5	2/0	85	16.7	0.04			0.5	17.5	1.45
		32			19/17	0/0	112.9	36.5	0.08			0.6	29.5	1.34
		39	24 (156/58)				110.6	26.5	0.09	0.03	<8	1.43	4.6	1.66
Mother	Secondary amenorrhoea (33 years)	63	38 (155/90)	56 (0)	Normal ranges	Follicular phase	2.9–120.0	1.5–8.0	0.06–0.56	2.2–6.8	10–320	0.4–2.0	0.7–25.0	0.3–4.2
						Ovulatory phase	6.3–24.0	9.6–80	0.16–0.78					
Father		70	17 (170/50)	55 (0)		Luteal phase	1.5–7.0	0.2–6.5	0.34–2.1					
Brother		45	28 (170/80)	55 (0)		Menopause	17–95	8–33	<0.2					

NA: not applied
AMH, anti-Müllerian hormone; BMI, body mass index; E2, estradiol; FSH, follicle-stimulating hormone; HC, head circumference; InhB, inhibine B; L, left; LH, luteinising hormone; PRL, prolactin; R, right; T, testosterone; TSH, thyroid-stimulating hormone.

staining appeared as thick threads, likely corresponding to meiotic chromosomes. These results show that BRCA2 is indeed present on chromosomes in foetal human oocytes when meiotic DSB repair occurs.

R2842C-BRCA2 displays a reduced DSB-induced HR efficiency

Although referenced in ClinVar (VCV000052610) and in the COSMIC database of variants in cancer (COSM23938), *R2842C-BRCA2* is considered as a variant of unknown significance for breast cancer predisposition (Variant of Unkown Significance (VUS), International Agency for Cancer Research (IARC) class 3). Previous attempt to classify BRCA2 VUS in a hamster lung fibroblast cell line or in mouse embryonic stem cells showed that this variant displayed a decrease in HR efficiency, at the limit for inferring pathogenicity.[25–29] Therefore, the significance of this variant and its classification as a causal variant for human pathology remained unclear. Since human and rodent cells differ in DSB repair efficiency and regulation, we analysed the specific impact of R2842C-BRCA2 on HR in human cells. We used the RG37 cell line,[17] a human SV40 immortalised fibroblast line bearing the DR-GFP substrate[18] that monitors gene conversion induced by targeted cleavage by the I-SceI meganuclease (figure 3A). Both the expression of WT-BRCA2 and R2842C-BRCA2 stimulated the efficiency of DSB-induced HR (figure 3B). We then silenced the endogenous *BRCA2* using a specific siRNA targeting its 3′UTR sequence and complemented these cells with either the WT or mutated BRCA2 (figure 3C). As expected, silencing endogenous *BRCA2* decreased HR efficiency, and WT-BRCA2 fully complemented HR efficiency. R2842C-BRCA2, expressed at similar levels than WT-BRCA2, only partially complemented HR efficiency, to 67%±6% compared with WT-BRCA2 (figure 3B).

Interestingly, our results are in line with the functional impact on HR recently studied to classify variants of unknown significance or associated with a high risk of cancer using mouse embryonic stem cells.[28] In this study, the residual HR activity of the R2842C variant is almost identical to what we obtained (31% and 33%, respectively). Mesman *et al* also studied other missense variants, classified as benign (class 1), likely benign (class 2) or with unknown significance (class 3, VUS), or associated with a high risk of cancer, such as the R3052W and the G2609D variants. The conclusion is that the residual HR of our variant (R2842C) is intermediate between the pathogenic or likely pathogenic variants (class 4 or 5, such as R3052W or G2609D) with a residual HR of <30%, and those classified as benign, likely benign or VUS with a residual HR of >50%.[28]

These data show that the *R2842C-BRCA2* variant partially affects HR efficiency in human cells. This significant residual activity could account for the absence of developmental defects in the patient.

Increased chromosomal instability in the patient's cells

Hypersensitivity to the chromosome-breaking effect of cross-linking agents is a reliable marker of FA.[30] Therefore, we studied MMC-induced chromosomal breaks in lymphoblastoid cells derived from the patient, her mother, two fertile control women and an FA patient (FANCD1). In the absence of MMC, few spontaneous breaks were observed in cells derived from the proposita and the patient with FANCD1 (figure 4A,B). On exposure to 300 nM MMC, healthy cells are expected to show one to five breaks/cell in no more than 30% of the cells, whereas for a patient with bona fide FA, no undamaged cells are left and most cells show more than 10 breaks/cell.[30] At 300 nM MMC, all FANCD1

J Med Genet: first published as 10.1136/jmedgenet-2019-106672 on 1 June 2020. Downloaded from http://jmg.bmj.com/ on June 2, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

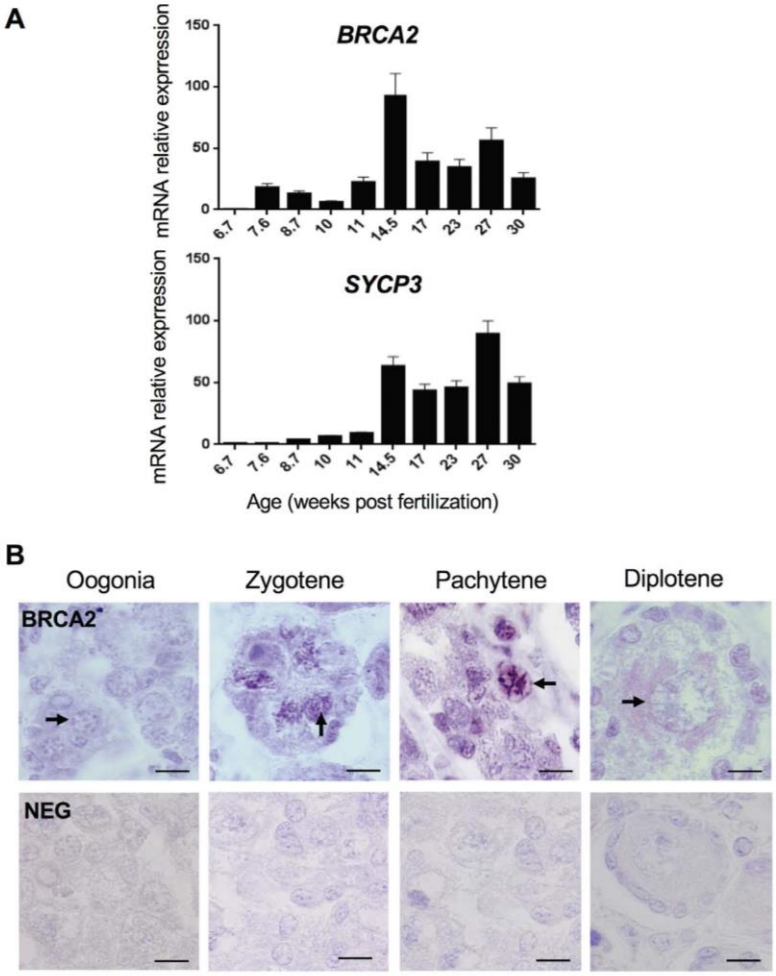


Figure 2 BRCA2 expression in human foetal ovaries. (A) *BRCA2* mRNAs were quantified by quantitative reverse transcription PCR from total RNA of pooled human foetal ovaries from various developmental stages (above). Beta-actin was used as a reference, and expression is provided as percentage of the maximum. each RNA library was analysed in triplicate and the bar indicates the mean. Quantification of *SYCP3* mRNA is shown at the same stages for comparison (below). (B) BRCA2 immunostaining (purple) in the cortex of a 24-weeks postfertilisation human ovary. Meiotic chromosomes are stained in zygotene and pachytene stages oocytes. No staining is observed when immunohistochemistry is performed in the absence of primary antibody (NEG). Arrows point to germ cells at the indicated stage. Scale bar: 10 µm. NEG, negatif; mRNA, messenger RNA.

cells presented breaks, as expected, while the patient's cells exhibited a slight increase of chromosomal breaks, compared with the heterozygous mother's and the WT control's cells. Indeed, the number of breaks in the patient's cells was only 10 times the number in WT cells compared with 41 times in FANCD1's cells. Furthermore, at high MMC dose (1000 nM), while breaks in FANCD1 cells were too numerous to be quantified, the patient's cells presented only a modest increase of breaks. Therefore, our data show that the patient's cells display moderately increased levels of chromosomal breaks compared with WT cells, a cellular phenotype distinct from the typical FANCD1 hypersensitivity.

Reduced proliferation rate of the patient's primary fibroblasts

Then we compared the proliferation rate of primary fibroblasts from the patient with POI, WT controls and a patient with FANCD1. As expected, the proliferation of FANCD1 cells was markedly affected when compared with WT cells (figure 4C). Remarkably, the patient's fibroblasts exhibited a reduced proliferation rate, intermediate between WT and FANCD1 cells.

Altered radiation-induced RAD51 foci formation in the patient's fibroblasts

The main role for BRCA2 is the loading of the pivotal RAD51 recombinase on damaged DNA, a crucial step for triggering HR. Therefore, we monitored the radiation-induced assembly of RAD51 foci, which are considered sites of HR initiation events. As expected, FANCD1 cells failed to assemble RAD51 foci (figure 5A,B). Consistent with the aforementioned data, the patient's cells showed an intermediate phenotype: indeed,

J Med Genet: first published as 10.1136/jmedgenet-2019-106672 on 1 June 2020. Downloaded from http://jmg.bmj.com/ on June 2, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

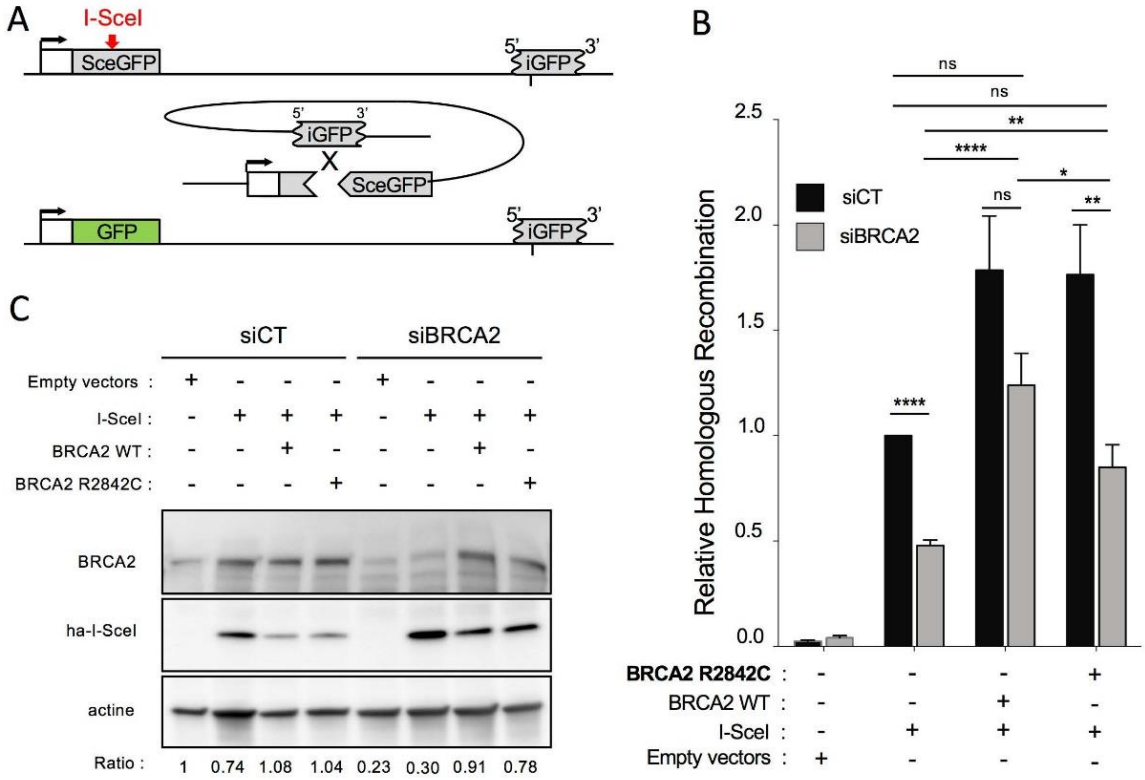


Figure 3 Impact of the *R2842C-BRCA2* variant on HR induced by targeted DSB. (A) schematic representation of the DR-GFP substrate for the study of HR. Two inactive GFP (iGFP and SceGFP) genes are organised into direct repeats. The I-SceI meganuclease generates a targeted DSB cleavage into the substrate (red). HR between the two GFP genes generates a functional GFP. The DR-GFP substrate is stably integrated in the SV40-transformed fibroblasts RG37 cell line, and the relative HR efficiency is quantified as the fraction of GFP-positive cells (ie, with a repaired GFP gene after targeted cleavage), scored by FACS. (B) HR efficiency, measured by the fraction of GFP+ cells, in cells expressing either the WT or the mutated BRCA2 protein (normalised to I-SceI transfected cells), and transfected either with a control siRNA (siCT) or a siRNA targeting the 3'UTR of endogenous *BRCA2* mRNA (siBRCA2). The values are normalised to the control and represent the average ±SEM (p values from Mann-Whitney test) for at least three independent experiments. (C) Expression of endogenous BRCA2 and exogenous WT-BRCA2 and R2842C-BRCA2. Twenty micrograms of total proteins extracted from cell lines expressing either the WT BRCA2 or the R2842C mutant were electroblotted in the presence of endogenous BRCA2 (siCT) or after specific silencing (siBRCA2). For each condition, the expression of I-SceI and BRCA2 and the efficiency of silencing were measured. We used β-actin as a loading control. Below: relative quantification of BRCA2 versus actin by quantification of bands intensity with ImageJ. * P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01, **** P ≤ 0.0001. DSB, double-strand break; HR, homologous recombination; WT, wild type.

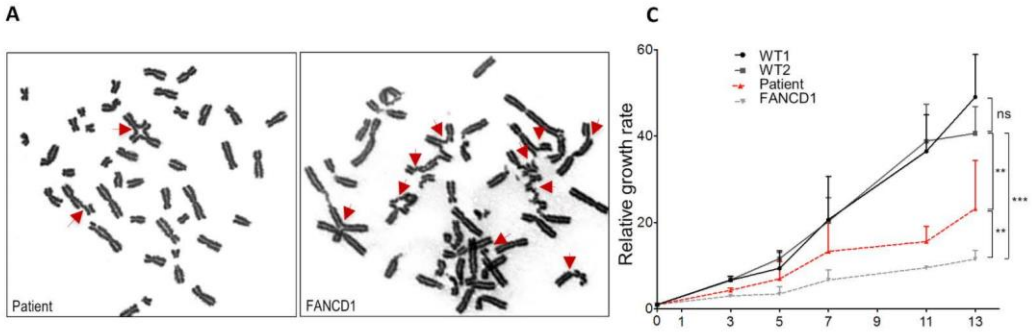
at 6 Gy, they assemble foci with kinetics comparable with WT cells, but the level of the plateau was about twofold lower than that in WT cells (figure 5B). A dose–response analysis confirmed the complete deficiency in RAD51 foci assembly for FANCD1 cells, at all irradiation doses (figure 5C,D). In the patient's cells, the number of RAD51 foci increased up to 2 Gy similarly to WT cells but did not further increase at higher doses (figure 5C,D; left panel). Consequently, the patient's cells showed lower levels of RAD51 foci at high doses (>2 Gy) when compared with WT cells (figure 5C,D; right panel). Together, these data show a dose-dependent sensitivity in the patient's cells, able to process low levels of DNA damage but failing to assemble RAD51 foci when faced with high levels of DNA damage.

Thus, in accordance with the recommendations of the ENIGMA consortium on functional assays for analysis of variants of uncertain significance of BRCA2,[26] our in vitro studies, including RAD51 foci formation and chromosomal breaks studies, confirm previously published data on the hypomorphic nature of the BRCA2-R2842C variant.[27 28] Regarding the clinical presentation of the patient, the aforementioned functional evidence, the ACMG-AMP classification and the Sherloc scoring framework[31] (online supplementary table s4), this variant can be considered as pathogenic.

No pathogenic variant was found in other FA genes

Biallelic pathological variants in two distinct genes of the FA pathway can be found in a single individual.[32] In order to rule out the hypothesis that the cellular phenotypes observed in the patient's cells could be due to mild biallelic variants in FA genes other than *BRCA2*, we have analysed the variants found by ES in the 26 other FA genes. The good coverage of each gene, the presence of heterozygous variants (both in coding regions and in UTRs or intronic regions) and unbiased allelic ratios exclude the possibility of having missed a pathogenic variant in another FA gene (online supplementary table s5). This analysis confirms

J Med Genet: first published as 10.1136/jmedgenet-2019-106672 on 1 June 2020. Downloaded from http://jmg.bmj.com/ on June 2, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.



B

	Aberrant metaphases			Breaks/ metaphase			Radial figures		
	Untreated	MMC (300 nM)	MMC (1000 nM)	Untreated	MMC (300 nM)	MMC (1000 nM)	Untreated	MMC (300 nM)	MMC (1000 nM)
Control	0/50 (0%)	1/50 (2%)	3/20 (15%)	0	0,14	0,21	0/50 (0%)	0/50 (0%)	1/20 (5%)
Mother	0/50 (0%)	2/50 (4%)	3/18 (17%)	0	0,2	0,39	0/50 (0%)	1/50 (2%)	1/18 (6%)
Patient	1/50 (2%)	9/50 (18%)	11/25 (44%)	0,02	0,38	1,04	0/50 (0%)	2/50 (4%)	4/25 (16%)
FANCD1	4/50 (8%)	41/41 (100%)	20/20 (100%)	0,08	4,5	high	0/50 (0%)	35/41 (85%)	numerous

Figure 4 Increased chromosomal instability and reduced proliferation rate in the patient's cells. (A) Chromosomal breaks analysis of lymphoblastoid cell lines. Metaphases in the patient's and FANCD1's cells in the presence of 300 nM MMC. Chromosomal breaks and radial figures are shown (arrowheads). (B) Quantification of chromosomal breaks in lymphoblastoid cell lines derived from the patient, the mother, an FA patient (FANCD1) and a WT control, in the absence or in the presence of MMC. (C) Reduced proliferation rate of the patient's primary fibroblasts. Cells from the patient with POI, two WT controls (WT1 and WT2) and an FA patient (FANCD1) were cultured in six-well plates and counted every 2–3 days during 13 days. The value corresponds to the mean±SEM of at least three independent experiments. The statistical significance was calculated from rope comparison of linear regression of growth curves. MMC, mitomycin C; WT, wild type.

that the cellular phenotypes observed in the patient's cells are not due to variants in FA genes other than *BRCA2*. In particular, no variants of *RAD51* could explain the defects in foci assembly detected in the patient's cells.

DISCUSSION

We report here a *BRCA2* homozygous hypomorphic variant in a patient with POI, and, remarkably, without cancer or FA trait in the patient and her family. The patient clearly presents an isolated POI because she has no characteristic clinical signs of FA, such as congenital malformations or skin pigmentation abnormalities.[33] She also has a normal head circumference, and her size, similar to that of her heterozygous mother, is within normal ranges (according to Turkish data[34]). The fact that she does not present any bone marrow failure or malignancy, together with the lack of FA case in all her family, also excludes the possibility of a 'Fanconi-like' syndrome, such as the Estren-Dameshek syndrome, a mild form of FA. In this syndrome, very few or no congenital anomalies could be found in patients, but the diagnosis of a classical FA was made by characteristic cytogenetic analysis in the patient and by typical phenotypes found in the same sibship.[33] At the cytogenetic level, the most specific criteria for FA is the hypersensitivity of patients' somatic cells to cross-linking agents. On exposure to MMC, our patient's cells exhibited only a slight increase of chromosomal breaks compared with WT control cells. These cellular defects are largely below the instability observed in typical FA cells,[30] and somatic mosaicism was excluded because of the homogeneity of the variant detection provided by ES. Therefore, this patient cannot be considered clinically as an FA case.

The filtering of variants obtained by ES in our patient yielded the BRCA2 R2842C variant as the only candidate to be involved in the POI of our patient. A highly likely role for BRCA2 in germ cell HR stems from several lines of evidence. Meiotic recombination is a complex and highly regulated process occurring in meiotic prophase I that involves specific meiotic factors such as MEIOB and known BRCA2 partners such as DMC1 and MEILB2.[35–38] BRCA2 has also been shown to be essential for meiotic DNA repair in various animal models, such as zebrafish, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila*.[14 39–41] In mouse, the rescue of the invalidated murine gene with a human transgene led to low levels of functional protein and to a complete impairment of male meiosis and a 10-fold loss of the follicular pool, with numerous meiotic abnormalities in the remaining oocytes.[23] Very recently, it was shown in mouse that an oocyte-specific *Brca2* invalidation leads to meiotic impairment, germ cell depletion and infertility.[11 22]

While the role and clinical impact of homozygous and heterozygous *BRCA2* variants in mitotic cells are widely studied, the impact of such defects in human germ cells remains less understood, mainly because almost all patient with FANCD1 die before puberty. Here, we show that BRCA2 mRNA and protein are indeed expressed in human foetal ovaries in pachytene stage oocytes, when meiotic HR occurs. The main role of BRCA2 is the loading of the pivotal recombinase RAD51 on damaged DNA to allow the repair of DSBs by HR. The location of the variant in

J Med Genet: first published as 10.1136/jmedgenet-2019-106672 on 1 June 2020. Downloaded from http://jmg.bmj.com/ on June 2, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

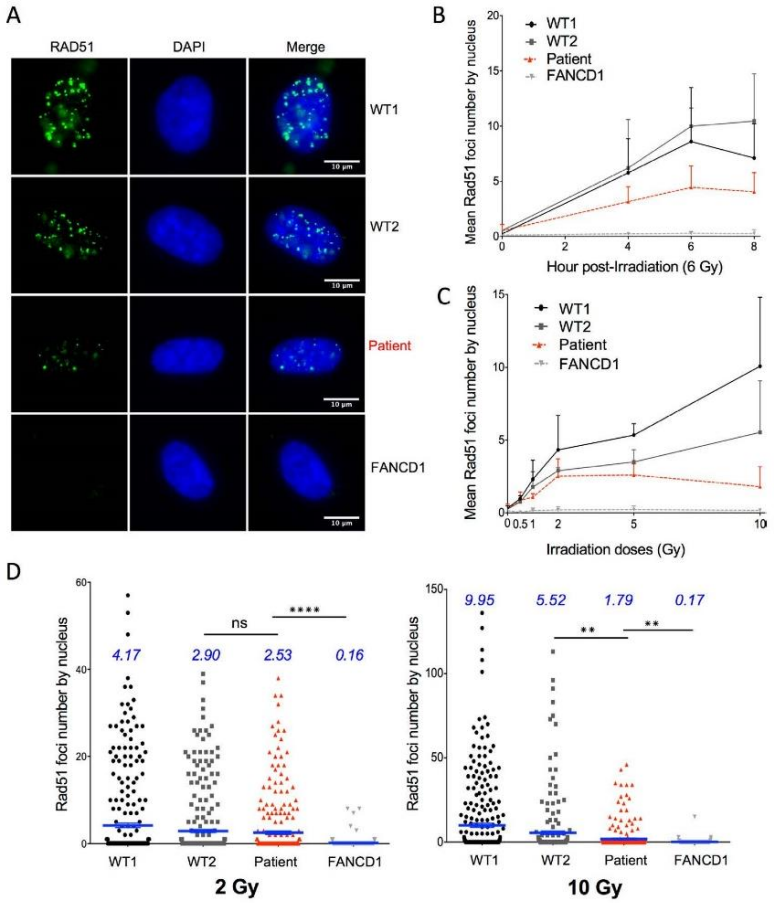


Figure 5 Dose-sensitive alteration of RAD51 foci formation in the patient's cells. (A) Rad51 nuclear foci assembly in irradiated primary fibroblasts from the patient, two WT controls and an FA patient (FANCD1) (6 Gy, 6 hours). Fixed and permeabilised cells were probed with an anti-RAD51 antibody. (B) Kinetics of Rad51 foci assembly (6 Gy) in irradiated primary fibroblasts. (C,D) Dose–response of Rad51 foci assembly (6-hour postirradiation) in irradiated primary fibroblasts. (C) Complete dose–response of Rad51 foci per nucleus; (D) Rad51 foci at low (2 Gy, left panel) and high (10 Gy, right panel) levels of irradiation, respectively (medians are in blue (n=3)). (B,C) The values correspond to the mean±SEM (n=3); p values (stars) were obtained with the Mann-Whitney test. WT, wild type.

the ssDNA-binding domain of BRCA2 suggests it can affect the protein function. Indeed, using an HR reporter assay, we showed that the R2842C-BRCA2 mutant exhibited a reduced DSB-induced HR efficiency. Consistently, the patient's cells display a reduced proliferation rate and a dose-sensitive alteration of radiation-induced assembly of RAD51 foci. Furthermore, we verified that these somatic cellular defects could not be attributed to variants in other genes implicated in the FA pathway. Taken together, our data strongly support a crucial role of BRCA2 in human meiotic HR, and therefore a likely impact of R2842C-BRCA2 reduced activity in this process in our patient with POI.

Our observation describes the first adult patient with fully isolated POI due to a biallelic variant in *BRCA2*, without cancer or FA traits despite a detailed clinical and cytogenetic description. Indeed, patients carrying biallelic damaging variants in *BRCA2* usually present with the severe FANCD1 syndrome and die before puberty. The possibility of a heterogeneous clinical presentation in carriers of biallelic *BRCA2* variants is currently emerging from the report of older patients. As shown in online supplementary table s6, we can conclude that in all previous patients with POI, there was either evidence of FA or not enough information to fully exclude it, especially microcephaly and short stature (frequently reported in patients with FA related to FANCD1 mutations[42]) and absence of cytogenetic studies, critical for the diagnosis of FA.

Heterozygous BRCA2 variants increase susceptibility to familial breast and ovarian cancers.[43] Such increased susceptibility has not been observed in our patient's family. Furthermore, the fact that neither the patient nor her relatives have yet developed other pathologies implies that the R2842C-BRCA2 variant is hypomorphic and retains a residual HR activity, as supported by our functional studies. Interestingly, we showed that RAD51 foci assembly was not affected at low irradiation doses in the patient's somatic cells. In addition, the patient's cells displayed

J Med Genet: first published as 10.1136/jmedgenet-2019-106672 on 1 June 2020. Downloaded from http://jmg.bmj.com/ on June 2, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

a growth rate and levels of chromosomal breaks intermediate between those of WT and FANCD1 cells. The residual HR activity of the R2842C-BRCA2 mutant could account for the absence of somatic pathologies in vivo. Somatic cells are rarely spontaneously confronted with high levels of simultaneous DSBs, while by contrast, meiotic recombination in germ cells is initiated by hundreds of DSBs requiring HR to form crossing-overs mandatory to produce functional haploid gametes.[38] In our functional test, RAD51 foci assembly by the mutated BRCA2 was significantly decreased at high doses (>5 Gy), generating a great number of DSBs (with an estimation of 30–40 DSB/Gy/mammalian genome[44]). Therefore, the R2842C-BRCA2 variant could be expected to affect the processing of such a high number of simultaneous meiotic DSBs.

The study of DNA repair-deficient knock-out mouse models and in vitro assays suggest that oocytes are equipped to execute the repair of a wide variety of DNA lesions.[45] DNA repair genes such as *MLH1*, *PMS2*, *MSH6* and *ERCC1* are also expressed in the ovary[45] and play a major role in ensuring female fertility. Major alteration of these genes are involved in many non-reproductive cancers such as Lynch syndrome or skin cancers.[45] Thus, in the same way, we can speculate that hypomorphic variants of many of these DNA repair genes will be identified in isolated POI cases without evident somatic pathology.

The hypomorphic nature of a *BRCA2* variant does not exclude a risk of cancer. Indeed, in a recent case–control study on breast cancer using genotyping data from almost 50 000 cases (48.159 cases and 48.231 controls), it was shown that the hypomorphic missense variants of *BRCA2* are associated with a moderate risk of breast cancer and therefore require appropriate long-term monitoring.[46] In particular, variants G2508S and W3035S with a residual HR activity of 50% according to Mesman and colleagues[28] are associated with a moderate risk of breast cancer in Asian and in the European populations, respectively.[46]

It is therefore reasonable to propose that clinical management of patients with POI harbouring hypormophic variants of *BRCA2* (residual HR ≤50% as described by Mesman *et al*, demonstrated by functional assays), as in our patient, should include intensified screening programmes, and presymptomatic genetic testing for other family members should be discussed. Regarding the possibility of undergoing prophylactic surgery, there is no point in maintaining a risk of ovarian cancer, and an oophorectomy should therefore be discussed in these patients, since patients with POI with biallelic *BRCA2* mutations have small ovaries without follicle. In addition, according to the current literature, we suggest favouring a breast monitoring approach rather than a mastectomy.

In conclusion, we describe and functionally characterise here a homozygous hypomorphic variant of *BRCA2* in a patient with isolated POI. As *BRCA2* is a major susceptibility gene for breast and ovarian cancer, this observation should change the genetic counselling and pretest information for patients with POI. Indeed, the genetic counselling should now be addressed while keeping in mind a possible defect in a major DNA repair gene such as *BRCA2*. More generally, this study also has a wide impact for the understanding of the processes controlling genome plasticity and the consequences of their defects in somatic and germ cells.

Twitter Sandrine Caburet @SCaburet

Acknowledgements We thank Baptiste Fouquet for his help in some experiments, Jean Soulier and the Cellulothèque des hémopathies de l'Hôpital Saint-Louis for the gift of FANCD1 primary fibroblasts and Alexandra Benachi for foetal ovaries.

Contributors MM, BSL and GL designed research studies. ED, AH, ST and SM conducted experiments. SC, ED, AH, GL, BSL and MM acquired and analysed data. AH, HC and ML collected clinical data and biological samples of the patient and their parents. MM, BSL, SC, AH and GL wrote the manuscript.

Funding This study was supported by Université Paris Diderot (SC), Université Paris Sud-Paris Saclay (ED, AH and MM), by the Agence Nationale de Biomédecine (AH and MM) and by Institut Universitaire de France (GL). BSL was supported by the Ligue Nationale contre le cancer 'Equipe labellisée 2017', Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE12-0011-02 and ANR-16-CE18-0012-02), AFM-Téléthon and Institut National du Cancer (INCa-PLBIO18-232).

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Obtained.

Ethics approval The study was approved by all the institutions involved and by the Agence de Biomedecine (reference number PFS12-002).

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement Data are available upon reasonable request. Data supporting the claims made in this paper are available upon request after its publication.

ORCID iDs
Sandrine Caburet http://orcid.org/0000-0002-7404-8213
Elodie Dardillac http://orcid.org/0000-0002-2069-8309
Micheline Misrahi http://orcid.org/0000-0002-5379-8859

REFERENCES

1 Huhtaniemi I, Hovatta O, La Marca A, Livera G, Monniaux D, Persani L, Heddar A, Jarzabek K, Laisk-Podar T, Salumets A, Tapanainen JS, Veitia RA, Visser JA, Wieacker P, Wolczynski S, Misrahi M. Advances in the molecular pathophysiology, genetics, and treatment of primary ovarian insufficiency. *Trends Endocrinol Metab* 2018;29:400–19.
2 Wood-Trageser MA, Gurbuz F, Yatsenko SA, Jeffries EP, Kotan LD, Surti U, Ketterer DM, Matic J, Chipkin J, Jiang H, Trakselis MA, Topaloglu AK, Rajkovic A. Mcm9 mutations are associated with ovarian failure, short stature, and chromosomal instability. *Am J Hum Genet* 2014;95:754–62.
3 AlAsiri S, Basit S, Wood-Trageser MA, Yatsenko SA, Jeffries EP, Surti U, Ketterer DM, Afzal S, Ramzan K, Faiyaz-Ul Haque M, Jiang H, Trakselis MA, Rajkovic A. Exome sequencing reveals MCM8 mutation underlies ovarian failure and chromosomal instability. *J Clin Invest* 2015;125:258–62.
4 Fouquet B, Pawlikowska P, Caburet S, Guigon C, Mäkinen M, Tanner L, Hietala M, Urbanska K, Bellutti L, Legois B, Bessieres B, Gougeon A, Benachi A, Livera G, Rosselli F, Veitia RA, Misrahi M. A homozygous *FANCM* mutation underlies a familial case of non-syndromic primary ovarian insufficiency. *Elife* 2017;6. doi:10.7554/eLife.30490
5 Hoeijmakers JHJ. Dna damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 2009;361:1475–85.
6 Lambert S, Lopez BS. Characterization of mammalian Rad51 double strand break repair using non-lethal dominant-negative forms. *Embo J* 2000;19:3090–9.
7 Moynahan ME, Pierce AJ, Jasin M. Brca2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell* 2001;7:263–72.
8 Tsuzuki T, Fujii Y, Sakumi K, Tominaga Y, Nakao K, Sekiguchi M, Matsushiro A, Yoshimura YTargeted disruption of the RAD51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:6236–40.
9 Ludwig T, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A. Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of BRCA1, BRCA2, BRCA1/BRCA2, Brca1/p53, and Brca2/p53 nullizygous embryos. *Genes Dev* 1997;11:1226–41.
10 Sharan SK, Morimatsu M, Albrecht U, Lim DS, Regel E, Dinh C, Sands A, Eichele G, Hasty P, Bradley A. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by RAD51 in mice lacking BRCA2. *Nature* 1997;386:804–10.
11 Tsui V, Crismani W. The Fanconi anemia pathway and fertility. *Trends Genet* 2019;35:199–214.
12 Tischkowitz M, Xia B. PALB2/FANCN: recombining cancer and Fanconi anemia. *Cancer Res* 2010;70:7353–9.
13 Meyer S, Tischkowitz M, Chandler K, Gillespie A, Birch JM, Evans DG. Fanconi anaemia, BRCA2 mutations and childhood cancer: a developmental perspective from clinical and epidemiological observations with implications for genetic counselling. *J Med Genet* 2014;51:71–5.
14 Weinberg-Shukron A, Rachmiel M, Renbaum P, Gulsuner S, Walsh T, Lobel O, Dreifuss A, Ben-Moshe A, Zeligson S, Segel R, Shore T, Kalifa R, Goldberg M, King M-C, Gerlitz O, Levy-Lahad E, Zangen D. Essential role of BRCA2 in ovarian development and function. *N Engl J Med* 2018;379:1042–9.
15 Qin Y, Zhang F, Chen Z-J. Brca2 in ovarian development and function. *N Engl J Med* 2019;380:1086.
16 Turchetti D, Zuntini R, Tricarico R, Bellacosa A. Brca2 in ovarian development and function. *N Engl J Med* 2019;380:1086–7.

J Med Genet: first published as 10.1136/jmedgenet-2019-106672 on 1 June 2020. Downloaded from http://jmg.bmj.com/ on June 2, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

17 Dumay A, Laulier C, Bertrand P, Saintigny Y, Lebrun F, Vayssière J-L, Lopez BS, Bax LBS. Bax and Bid, two proapoptotic Bcl-2 family members, inhibit homologous recombination, independently of apoptosis regulation. *Oncogene* 2006;25:3196–205.
18 Pierce AJ, Johnson RD, Thompson LH, Jasin M. Xrcc3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev* 1999;13:2633–8.
19 Liang F, Han M, Romanienko PJ, Jasin M. Homology-Directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:5172–7.
20 Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH, Zheng N, Chen P-L, Lee W-H, Pavletich NP. Brca2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* 2002;297:1837–48.
21 Martinez JS, von Nicolai C, Kim T, Ehlén Åsa, Mazin AV, Kowalczykowski SC, Carreira A. Brca2 regulates DMC1-mediated recombination through the BRC repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:3515–20.
22 Miao Y, Wang P, Xie B, Yang M, Li S, Cui Z, Fan Y, Li M, Xiong B. Brca2 deficiency is a potential driver for human primary ovarian insufficiency. *Cell Death Dis* 2019;10.
23 Sharan SK, Pyle A, Coppola V, Babus J, Swaminathan S, Benedict J, Swing D, Martin BK, Tessarollo L, Evans JP, Flaws JA, Handel MA. Brca2 deficiency in mice leads to meiotic impairment and infertility. *Development* 2004;131:131–42.
24 Chen J, Silver DP, Walpita D, Cantor SB, Gazdar AF, Tomlinson G, Couch FJ, Weber BL, Ashley T, Livingston DM, Scully R. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell* 1998;2:317–28.
25 Guidugli L, Pankratz VS, Singh N, Thompson J, Erding CA, Engel C, Schmutzler R, Domchek S, Nathanson K, Radice P, Singer C, Tonin PN, Lindor NM, Goldgar DE, Couch FJ. A classification model for BRCA2 DNA binding domain missense variants based on homology-directed repair activity. *Cancer Res* 2013;73:265–75.
26 Guidugli L, Carreira A, Caputo SM, Ehlen A, Galli A, Monteiro ANA, Neuhausen SL, Hansen TVO, Couch FJ, Vreeswijk MPG, ENIGMA consortium. Functional assays for analysis of variants of uncertain significance in BRCA2. *Hum Mutat* 2014;35:151–64.
27 Guidugli L, Shimelis H, Masica DL, Pankratz VS, Lipton GB, Singh N, Hu C, Monteiro ANA, Lindor NM, Goldgar DE, Karchin R, Iversen ES, Couch FJ. Assessment of the clinical relevance of BRCA2 missense variants by functional and computational approaches. *Am J Hum Genet* 2018;102:233–48.
28 Mesman RLS, Calléja FMGR, Hendriks G, Morolli B, Misovic B, Devilee P, van Asperen CJ, Vrieling H, Vreeswijk MPG. The functional impact of variants of uncertain significance in BRCA2. *Genetics in Medicine* 2019;21:293–302.
29 Hart SN, Hoskin T, Shimelis H, Moore RM, Feng B, Thomas A, Lindor NM, Polley EC, Goldgar DE, Iversen E, Monteiro ANA, Suman VJ, Couch FJ. Comprehensive annotation of BRCA1 and BRCA2 missense variants by functionally validated sequence-based computational prediction models. *Genet Med* 2019;21:71–80.
30 Oostra AB, Nieuwint AWM, Joenje H, de Winter JP. Diagnosis of Fanconi anemia: chromosomal breakage analysis. *Anemia* 2012;2012:1–9.
31 Nykamp K, Anderson M, Powers M, Garcia J, Herrera B, Ho Y-Y, Kobayashi Y, Patil N, Thusberg J, Westbrook M, Topper S, Invitae Clinical Genomics Group. Sherloc: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genet Med* 2017;19:1105–17.
32 Singh TR, Bakker ST, Agarwal S, Jansen M, Grassman E, Godthelp BC, Ali AM, Du C-hu, Rooimans MA, Fan Q, Wahengbam K, Steltenpool J, Andreassen PR, Williams DA, Joenje H, de Winter JP, Meetei AR. Impaired FANCD2 monoubiquitination and hypersensitivity to camptothecin uniquely characterize Fanconi anemia complementation group M. *Blood* 2009;114:174–80.
33 Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res* 2009;668:4–10.
34 Neyzi O, Furman A, Bundak R, Gunoz H, Darendeliler F, Bas F. Growth references for Turkish children aged 6 to 18 years. *Acta Paediatr* 2006;95:1635–41.
35 Crickard JB, Kaniecki K, Kwon Y, Sung P, Greene EC. Meiosis-Specific recombinase Dmc1 is a potent inhibitor of the Srs2 antirecombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115:E10041–8.
36 Souquet B, Abby E, Hervé R, Finsterbusch F, Tourpin S, Le Bouffant R, Duquenne C, Messiaen S, Martini E, Bernardino-Sgherri J, Toth A, Habert R, Livera G. MEIOB targets single-strand DNA and is necessary for meiotic recombination. *PLoS Genet* 2013;9:e1003784.
37 Yoshida K, Kondoh G, Matsuda Y, Habu T, Nishimune Y, Morita T. The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell* 1998;1:707–18.
38 Zhang J, Fujiwara Y, Yamamoto S, Shibuya H. A meiosis-specific BRCA2 binding protein recruits recombinases to DNA double-strand breaks to ensure homologous recombination. *Nat Commun* 2019;10:722.
39 Rodríguez-Marí A, Wilson C, Titus TA, Cañestro C, BreMiller RA, Yan Y-L, Nanda I, Johnston A, Kanki JP, Gray EM, He X, Spitsbergen J, Schindler D, Postlethwait JH. Roles of BRCA2 (fancd1) in oocyte nuclear architecture, gametogenesis, gonad tumors, and genome stability in zebrafish. *PLoS Genet* 2011;7:e1001357.
40 Ko E, Lee J, Lee H. Essential role of brc-2 in chromosome integrity of germ cells in C. elegans. *Mol Cells* 2008;26:590–4.
41 Klovstad M, Abdu U, Schüpbach T. Drosophila BRCA2 is required for mitotic and meiotic DNA repair and efficient activation of the meiotic recombination checkpoint. *PLoS Genet* 2008;4:e31.
42 Alter BP, Rosenberg PS, Brody LC. Clinical and molecular features associated with biallelic mutations in FANCD1/BRCA2. *J Med Genet* 2007;44:1–9.
43 Walsh T, Casadei S, Lee MK, Pennil CC, Nord AS, Thornton AM, Roeb W, Agnew KJ, Stray SM, Wickramanayake A, Norquist B, Pennington KP, Garcia RL, King M-C, Swisher EM. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:18032–7.
44 Ruiz de Almodóvar JM, Steel GG, Whitaker SJ, McMillan TJ. A comparison of methods for calculating DNA double-strand break induction frequency in mammalian cells by pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol* 1994;65:641–9.
45 Stringer JM, Winship A, Liew SH, Hutt K. The capacity of oocytes for DNA repair. *Cell Mol Life Sci* 2018;75:2777–92.
46 Shimelis H, Mesman RLS, Von Nicolai C, Ehlen A, Guidugli L, Martin C, Calléja F, Meeks H, Hallberg E, Hinton J, Lilyquist J, Hu C, Aalfs CM, Aittomäki K, Andrulis I, Anton-Culver H, Arndt V, Beckmann MW, Benitez J, Bogdanova NV, Bojesen SE, Bolla MK, Borresen-Dale A-L, Brauch H, Brennan P, Brenner H, Broeks A, Brouwers B, Brüning T, Burwinkel B, Chang-Claude J, Chenevix-Trench G, Cheng C-Y, Choi J-Y, Collée JM, Cox A, Cross SS, Czene K, Darabi H, Dennis J, Dörk T, Dos-Santos-Silva I, Dunning AM, Fasching PA, Figueroa J, Flyger H, García-Closas M, Giles GG, Glendon G, Guénel P, Haiman CA, Hall P, Hamann U, Hartman M, Hogervorst FB, Hollestelle A, Hopper JL, Ito H, Jakubowska A, Kang D, Kosma V-M, Kristensen V, Lai K-N, Lambrechts D, Marchand LL, Li J, Lindblom A, Lophatananon A, Lubinski J, Machackova E, Mannermaa A, Margolin S, Marme F, Matsuo K, Miao H, Michailidou K, Milne RL, Muir K, Neuhausen SL, Nevanlinna H, Olson JE, Olswold C, Oosterwijk JJC, Osorio A, Peterlongo P, Peto J, Pharoah PDP, Pylkäs K, Radice P, Rashid MU, Rhenius V, Rudolph A, Sangrajrang S, Sawyer EJ, Schmidt MK, Schoemaker MJ, Seynaeve C, Shah M, Shen C-Y, Shrubsole M, Shu X-O, Slager S, Southey MC, Stram DO, Swerdlow A, Teo SH, Tomlinson I, Torres D, Truong T, van Asperen CJ, van der Kolk LE, Wang Q, Winqvist R, AH W, J-C Y, Zheng W, Zheng Y, Leary J, Walker L, Foretova L, Fostira F, Claes KBM, Varesco L, Moghadasi S, Easton DF, Spurdle A, Devilee P, Vrieling H, Monteiro ANA, Goldgar DE, Carreira A, Vreeswijk MPG, Couch FJ. For kConFab/AOCS Investigators, for NBCS Collaborators. BRCA2 hypomorphic missense variants confer moderate risks of breast cancer. *Cancer Res* 2017;77:2789–99.

J Med Genet: first published as 10.1136/jmedgenet-2019-106672 on 1 June 2020. Downloaded from http://jmg.bmj.com/ on June 2, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

3.1.2 Rôle essentiel de BRCA1 dans la fonction ovarienne révélé par des mutations bi-alléliques nulles chez une patiente avec Insuffisance ovarienne primitive débutante, sans cancer familial. Impact pour le conseil génétique et la prise en charge

Introduction

L'insuffisance ovarienne primitive (IOP), problème de santé publique, atteint 1-3.7% des femmes <40 ans (Huhtaniemi *et al.*, 2018a; Golezar *et al.*, 2019). Le séquençage nouvelle génération (NGS) a révélé sa forte hétérogénéité génétique. Les gènes de méiose/réparation de l'ADN sont dit constituer une famille majoritaire, /certains étant également liés à un risque oncologique. Nous avons montré récemment que deux gènes majeurs de la voie Fanconi, *FANCM* et *BRCA2* étaient responsables d'IOP isolée (Fouquet *et al.*, 2017a; Caburet *et al.*, 2020a). La mutation homozygote de *BRCA2* était hypomorphe, avec 33% d'activité de recombinaison homologue persistante, pouvant expliquer l'absence de manifestation somatique à l'état basal. Une fragilité chromosomique modérée était observée dans les cellules de la patiente en présence de mitomycine (MMC), intermédiaire entre une anémie de Fanconi (AF) et un contrôle (Caburet *et al.*, 2020a). Dans ce travail, nous décrivons la première patiente présentant une IOP associée à deux variants tronquants hétérozygotes composites du gène *BRCA1* identifiés par séquençage d'exome.

Présentation Clinique

L'arbre généalogique de cette famille d'origine Caucasienne est illustré dans la figure 9. Il s'agit d'une patiente de 16 ans qui nous a été adressée par le service d'endocrinologie de l'hôpital Necker pour le bilan génétique d'une IOP fluctuante associée à une forte diminution de la réserve ovarienne révélée par des bouffées de chaleur et des sueurs nocturnes invalidantes dès l'âge de 14 ans. Le bilan hormonal à

cet âge a révélé une FSH à 9.3 UI/l, une LH à 2.9 UI/L et un estradiol bas à 30 pg/L et surtout une AMH effondrée à 0.10 ng/mL (pour une norme à cet âge entre 2,45 et 5,95 ng/ml). Elle a été opérée à l'âge de 15 ans d'un adénome corticosurrénalien révélé par une hypertension artérielle associée à une hyperandrogénie et d'un nævus dysplasique de la jambe gauche sans signe de malignité à l'examen anatomopathologique. Elle avait développé une puberté à l'âge de 11 ans mais avec un seul cycle puis arrêt jusqu'à l'âge de 15 ans. Les cycles ont repris un mois après la chirurgie de l'adénome. L'examen à l'âge de 15 ans retrouve une taille de 1.57 m et poids de 58.9 kg pour un IMC de 23.9 kg/m^2. Elle présente également quelques taches-café-au lait. Sur le plan génétique, après une consultation d'oncogénétique à l'institut Gustave Roussy, la recherche des mutations germinales de TP53 s'est révélée négative ainsi que le séquençage de gène NF1 et SPRED1 dans l'hypothèse d'une neurofibromatose de type 1 où d'un syndrome NF1-like. Sur le plan familial, la mère de la patiente, d'origine portugaise, n'a pas d'antécédent notable à l'âge de 47 ans au moment de l'étude génétique. La tante maternelle de la patiente a été opérée d'une ovariectomie bilatérale avec hystérectomie à l'âge de 45 ans sans plus de précision. Le père de la patiente, d'origine brésilienne et perdu de vue, a été opéré à l'âge 47 ans d'un cholestéatome.

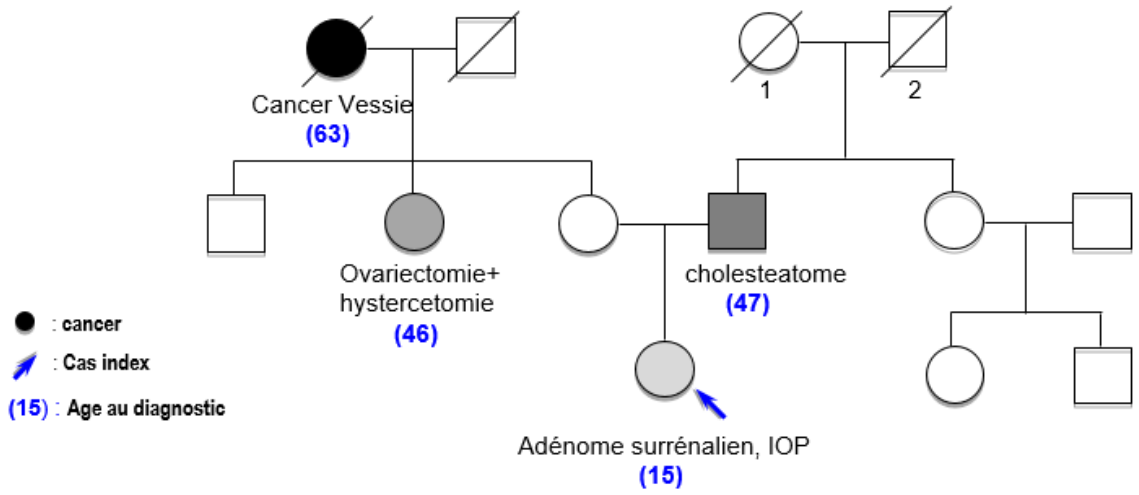


Figure 9 : Arbre généalogique de la famille

Séquençage de l'exome

Devant cette présentation clinique avec notamment cette très forte baisse de réserve ovarienne à cet âge, nous avons réalisé le séquençage de l'exome chez la patiente et sa mère. La préparation de la librairie, la capture de l'exome, et le séquençage lui-même ont été effectués par IntegraGen SA (Evry, France) selon un protocole interne standard. Brièvement, l'enrichissement a été réalisé à partir de 300 ng d'ADN, en utilisant le kit Agilent SureSelect Human All Exons version CRE (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Les librairies en paired-end de 75 paires de base ont été séquencées sur un NovaSeq, selon le protocole du fabricant. Le pipeline d'integragen comporte un alignement des séquences sur le génome de référence (GRCh38) avec le logiciel Elandv2e (Illumina, CASAVA1.8.2). L'appel de variants a été effectué à l'aide du logiciel GATK 3.4-46 et l'annotation des variants avec Annovar en utilisant, toutes les bases de données disponibles : dbSNP (dbSNP144), 1000 Genomes (phase1_release_v3.20101123), Exome Variant Server (ESP6500SI-V2-SSA137), et dans Exome Aggregation Consortium (ExAC r3.0), Gnomad exome et

génome ainsi qu'une database interne de IntegraGen. Les conséquences fonctionnelles des variants (stop, épissage, missense, synonyme…) ont été prédites avec le logiciel Variant Effect Predictor (VEP release 83).

L'analyse des variants détectés par exome a été effectuée comme décrit dans nos précédentes publications en utilisant Sirius, une interface web pour le filtre des variations génétiques identifiés par exome (sirius.integragen.com) (Heddar *et al.*, 2019a, 2020a). Pour les prédictions de pathogénicité *in silico* et les impacts des variants d'intérêt, nous avons utilisé tous les logiciels de prédiction disponibles via Varsome (Kopanos *et al.*, 2019) (https://varsome.com/) et dbNSFP (Liu *et al.*, 2016). Pour les variants d'épissage, nous avons utilisé tous les prédicteurs disponibles dans dbNSFP (Liu *et al.*, 2016) et la plateforme Mobidetails (https://mobidetails.iurc.montp.inserm.fr/MD/) ainsi que SpliceAI (Jaganathan *et al.*, 2019). Pour la classification des variants nous avons utilisé les recommandations internationales de *l'American College of Medical Genetics* and *Genomics* (ACMG) (Richards *et al.*, 2015). Nous avons testé les différentes hypothèses d'héritabilité devant cette forme sporadique :

1. Recherche de tous les variants rares homozygotes chez la patiente et hétérozygotes chez la mère.
2. La deuxième possibilité est la recherche de deux variants du même gène, dont l'un est transmis par le mère (modèle récessif mais avec deux mutations hétérozygotes composites).
3. Si aucune mutation n'a été retrouvée, nous testons le modèle dominant pour lequel une mutation transmise par le père, dans un gène sans effet sur la fertilité masculine, peut avoir un impact sur le développement ou la fonction des

ovaires.

Les variants pathogènes pertinents détectés ont été confirmés par séquençage Sanger.

Etude de fragilité chromosomique

La fragilité chromosomique en présence d'un agent intercalant, la MMC, oriente fortement vers une atteinte de la voie de réparation d'ADN de Fanconi (Auerbach, 2009; Oostra *et al.*, 2012). Par conséquent, nous avons étudié les cassures chromosomiques induites par la MMC dans les lymphocytes de la patiente et d'une femme fertile comme témoin. Les cellules lymphocytaires ont été cultivées dans des conditions standards de réalisation d'un caryotype. Pour tester l'hypersensibilité aux agents intercalants de l'ADN, nous avons rajouté la MMC après 48 heures de culture. Pour chaque échantillon, trois conditions ont été testées : sans MMC pour analyser les cassures spontanées, et avec 150 et 300 nM de MMC comme recommandé (Auerbach, 2009). Les cassures chromosomiques ont été quantifiées par une cytogénéticienne expérimentée à l'institut Gustave Roussy sur au moins 20 métaphases.

Résultat

Le séquençage de l'exome a permis de détecter 2 variants tronquants à l'état hétérozygote composite du gène *BRCA1*.

Le premier variant NM_007300.4: c.470_471del : p.Ser157Ter est une délétion de deux nucléotides dans l'exon 8 de *BRCA1* à l'origine d'un codon stop prématuré et vraisemblablement de la dégradation du transcrit correspondant par le système NMD.

Il est également connu dans la littérature comme 589_590delCT. Il s'agit d'un variant absent de toutes les bases de données de polymorphisme humain. Selon les critères ACMG et Clinvar ce variant est classé pathogène. En effet, à ce jour (31 octobre 2022), les 13 soumissions disponibles dans Clinvar rapportent ce variant comme pathogène dans le cadre de prédisposition génétique au cancer du sein et de l'ovaire (VCV000037608.40). Il s'agit d'un variant récurrent rapporté à l'état hétérozygote dans diverses cohortes de patientes atteintes du cancer du sein et/ou de l'ovaire dans différents groupes ethniques (Rebbeck *et al.*, 2018) notamment en Espagne (de la Hoya *et al.*, 2001; Díez *et al.*, 2003), Portugal (Pinto *et al.*, 2016), Brésil (Fernandes *et al.*, 2016; Palmero *et al.*, 2018), Chine (Kwong *et al.*, 2012; Bhaskaran *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019), Japon (Arai *et al.*, 2018), Malaisie (Wen *et al.*, 2018). L'impact fonctionnel de ce variant tronquant n'a pas encore été rapporté.

Le deuxième variant NM_007300.4: c.791_794del : p.Ser264MetfsTer33, hérité et d'origine maternelle, est également une délétion de 4 nucléotides dans l'exon 11 à l'origine soit d'une protéine tronquée soit de la dégradation de l'ARN messager correspondant par le système NMD (Non-mediated mRNA decay). Il s'agit d'un variant rare décrit uniquement à l'état hétérozygote chez deux hommes dans la base de données GnomAD exome (2/249.662 = $8.01x10^{-6}$). Ce variant est également pathogène selon les critères ACMG. A ce jour (31/10/2022), 7 soumissions dans ClinVar le rapportent comme pathogène (VCV000055705.33). Il est également connu dans la littérature sous les nomenclatures 910delGTTC, 910del4, et 910_913delGTTC. Il s'agit d'un variant récurrent rapporté à l'état hétérozygote dans diverses cohortes de patientes atteintes du cancer du sein et/ou de l'ovaire en Espagne (Llort *et al.*, 2002; Díez *et al.*, 2003; Blay *et al.*, 2013) et au Brésil (Alemar *et*

al., 2016; Maistro *et al.*, 2016; Palmero *et al.*, 2018).

L'étude de la fragilité chromosomique à partir des lymphocytes de la patiente retrouve une fragilité chromosomique typique de l'AF (Tableau 2, Figure 10) (Auerbach, 2009; Oostra *et al.*, 2012). En effet, le nombre de cassures par métaphase avec 150 nM MMC est plus de 400 fois supérieure au contrôle (437/50 versus 1/50 cassure(s)/métaphase) et 62 fois supérieure au taux retrouvé chez la patiente que nous avons rapportée précédemment avec IOP et le variant hypomorphe homozygote de BRCA2 : R2842C (7/50 cassures/métaphase) (Caburet *et al.*, 2020a). A 300 nM, toutes les cellules de la patiente présentent des cassures (> 30 cassures/métaphase). Des images radiales typiques de l'AF sont également observées avec les deux doses de MMC (Auerbach, 2009; Oostra *et al.*, 2012). Ces observations contrastent d'une part avec le phénotype clinique très modéré de la patiente et d'autre part avec son histoire familiale sans cancer habituellement associés aux mutations de BRCA1 (sein/ovaire).

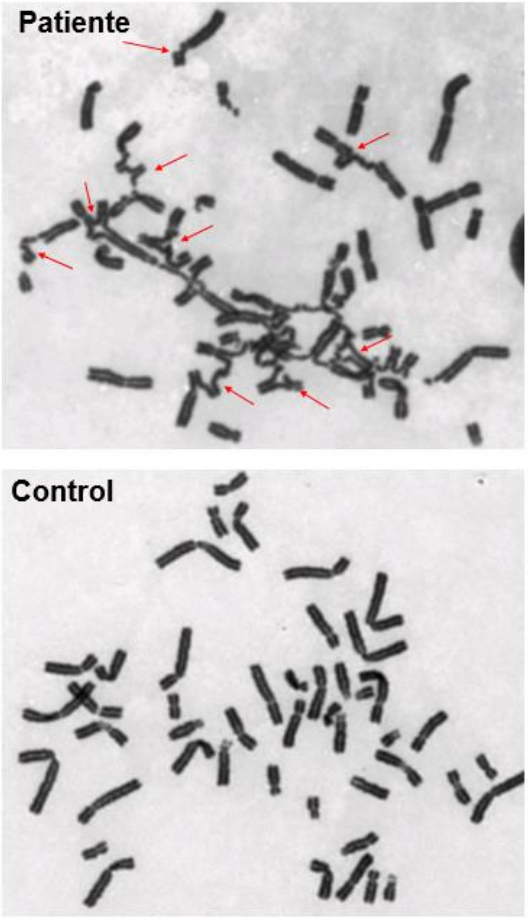


Figure 10 : Etude de la fragilité chromosomique en présence de mitomycine de la patiente (en haut) en comparaison à un controle (en bas)

Tableau 2 : Etude de la fragilité chromosomique des cellules de la patiente

	Gène	Génotype	Métaphases Aberrantes			Cassures / métaphase			Figures radiales		
			Non traité	MMC (150 nM)	MMC (300 nM)	Non traité	MMC (150 nM)	MMC (300 nM)	Non traité	MMC (150 nM)	MMC (300 nM)
Patiente 1*	BRCA2	Homozygote	1/50 (2%)	5/50 (10%)	9/50 (18%)	0,02	7/50 (0,14)	0,38	0/50 (0%)	2/50 (4%)	2/50 (4%)
Patient 2	**BRCA1**	**Hétérozygote Composite**	**4/50 (8%)**	**48/50 (96%)**	**30/30 (100%)**	**4/50 (0,08)**	**437/50 (8,74)**	**>30**	**0/50 (0%)**	**nombreux**	**très nombreux**
Control	WT	WT	0/50 (0%)	1/50 (2%)	1/50 (2%)	0	1/50 (0,02)	0,14	0/50 (0%)	0/50 (0%)	0/50 (0%)

** Caburet et al., 2020 ;MMC : mitomycine*

Les résultats préliminaires du western blot réalisé à partir des cellules de la patiente et de sa mère sont en faveur de la dégradation de l'ARN messager de *BRCA1* pourl'allèle paternel (c.470_471del) et d'une protéine tronquée issue de la traduction d'un transcrit alternatif pour l'allèle maternel (c.791_794del). Ce transcrit alternatif, déjà rapporté dans la littérature (Wang *et al.*, 2016; Seo *et al.*, 2018), résulte d'un skipping de la totalité ou de la quasi-totalité de l'exon 11 en utilisant un site cryptique d'épissage situé au niveau du nulcléotide c.787 (chr17: 41 246 761), soit 4 paires de base en amont de la mutation de notre patiente (c.791_794del) (Wang *et al.*, 2016; Seo *et al.*, 2018). La transcription à partir de ce site donneur alternatif entraîne la perte des nucléotides c.788–4096 de l'exon 11, et la traduction d'une isoforme courte de BRCA1 constitué de 759 acides aminés (au lieu de 1863 acides aminés de la forme complète (Full lenght). Cette isoforme conserve donc des domaines fonctionnels de l'extrémité N-terminale et C-terminale indispensable à l'intéraction avec d'autres protéines impliquées dans la recombinaison homologue notamment PALB2, BRCA2, RAD51, and CTIP (Wang *et al.*, 2016).

Discussion

Dans cette observation, nous avons identifié par séquençage de l'exome deux variants tronquants à l'état hétérozygote composite du gène *BRCA1* chez une jeune patiente de 17 ans d'origine mixte, espagnole par sa mère et Brésilienne par son père, et présentant une IOP débutante et fluctuante avec une forte altération de la réserve ovarienne. Nous montrons que les cellules lymphocytaires de la patiente présentent des cassures chromosomiques et des figures radiales induites par la MMC, largement supérieures en nombre à celles observées chez le témoin confirmant une altération de la voie de réparation de l'ADN de Fanconi.Les résultats préliminaires du Western Blot

révèlent que le premier variant (c.470_471del : p.Ser157Ter), d'origine paternelle, serait à l'origine d'une dégradation de l'ARN messager correspondant par NMD alors que le deuxième variant (c.791_794del) serait à l'origine d'une protéine tronquée de toute la partie codée par l'exon11. La protéine BRCA1 résultante est composée de 759 acides aminés et a conservé sa partie N-terminale et C-terminale indispensable pour l'interaction avec d'autres protéines de cette voie de réparation d'ADN (Wang *et al.*, 2016; Seo *et al.*, 2018). La réévaluation clinique après les résultats de l'étude génétique révèle que la patiente présente des signes mineurs de l'AF avec une petite taille relative (157 cm pour une taille cible de 169 cm) , des taches café-au-lait mais sans néoplasie du spectre de l'AF à l'âge de 17 ans. Ces résultats soutiennent le rôle causal des altérations moléculaires de *BRCA1* dans le phénotype de la patiente.

A l'état hétérozygote, *BRCA1* est le premier gène de prédisposition génétique au cancer du sein et de l'ovaire avec un risque cumulé à 80 ans de 72% (cancer du sein) et 44% (cancer de l'ovaire) (Kuchenbaecker *et al.*, 2017). A l'état homozygote ou hétérozygote composite, il est responsable de l'anémie de Fanconi, se présentant par des anomalies congénitales, une insuffisance médullaire, une prédisposition aux tumeurs solides et aux hémopathies malignes et souvent un décès précoce dans l'enfance (Auerbach, 2009; Sawyer *et al.*, 2015). Cependant, il s'agit d'une forme rare de l'anémie de Fanconi comparativement aux autres gènes responsables de ce syndrome comme *FANCA, FANCC* et *FANCG* (Taylor *et al.*, 2019).On compte à ce jour, 4 femmes âgées de 23 à 46 ans (Domchek *et al.*, 2013; Sawyer *et al.*, 2015; Keupp *et al.*, 2019; Kwong *et al.*, 2021) et 4 filles âgées de 2 à 7 ans présentant une anémie de Fanconi par altération biallélique de *BRCA1* (Freire *et al.*, 2018; Seo *et al.*, 2018). Dans tous les cas rapportés, le diagnostic a été fait devant un cancer, une

hémopathie ou des signes d'AF. De plus il semble persister une activité résiduelle prédite ou démontrée de BRCA1 chez ces patientes rapportées (Seo *et al.*, 2018; Kwong *et al.*, 2021). D'une manière intéressante, Seo *et al* ont rapporté deux variants tronquants homozygotes dans l'exon 11 de *BRCA1* identifiés dans deux formes familiales classiques d'AF (Seo *et al.*, 2018). Le variant p.Trp372ter identifié chez deux sœurs âgées de 5 et 6 ans et le variant p.Leu431Ter chez un patient de 15 ans et sa sœur de 7 ans (Seo *et al.*, 2018). Cette équipe a démontré chez ces patients un épissage alternatif dans l'exon 11 de *BRCA1*, à l'origine d'une délétion en phase de la quasi-totalité de l'exon 11 et d'une protéine BRCA1 courte contenant le domaine N-terminal et C-terminal (Seo *et al.*, 2018). Cette isoforme courte de BRCA1 est connue pour conserver une capacité partielle de réparation de l'ADN (Wang *et al.*, 2016; Seo *et al.*, 2018). Ceci est vraisemblablement le cas pour notre patiente selon les données préliminaires de notre Western Blot.

L'implication de BRCA1 dans les troubles de la fertilité n'a jamais été rapportée dans l'espèce humaine mais plusieurs arguments soutiennent son implication dans le phénotype de notre patiente. Les modèles de souris invalidées pour *BRCA1* ne sont pas viables (Matos-Rodrigues *et al.*, 2021). En revanche, l'inactivation de l'homologue de *BRCA1* chez C Elegans est responsable d'une altération majeure de la méiose et de la réparation des cassures double brin méiotiques(Li and Engebrecht, 2021). De plus les troubles de la fertilité sont un signe fréquent chez les patients atteints d'AF à la fois chez l'homme et la femme (Giri *et al.*, 2007; Tsui and Crismani, 2019). Récemment, notre équipe et d'autres dans le monde ont impliqué des gènes de cette voie de Fanconi à savoir *FANCM*, *BRCA2* et *FANCU* dans l'IOP soit dans formes complétement isolées d'IOP ou révélant des formes modérées d'une anémie de

Fanconi comme chez notre patiente (Fouquet *et al.*, 2017a; Weinberg-Shukron *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019b; Caburet *et al.*, 2020b).

Au total, Il s'agit de la première implication de BRCA1 dans l'IOP apparemment isolée démontrant son rôle essentiel dans la physiologie et la fonction ovarienne. Le phénotype modéré avec une IOP débutante sans cancer, peut être lié à une activité résiduelle de BRCA1 malgré une fragilité chromosomique typique de l'anémie de Fanconi et témoignant d'un défaut majeur de la voie de réparation d'ADN de Fanconi. Une prise en charge adaptée et multidisciplinaire pour la patiente avec un suivi à long terme sont fortement recommandés. Des études fonctionnelles supplémentaires sont en cours pour mieux caractériser l'impact des variants de *BRCA1* chez cette patiente.

Nouveau phénotype associé à une mutation bi-allélique de *MCM8* avec potentielle implication thérapeutique

Article 2: A Novel Phenotype Combining Primary Ovarian Insufficiency Growth Retardation and Pilomatricomas With MCM8 Mutation

Abdelkader Heddar, Dominique Beckers, Baptiste Fouquet, Dominique Roland, Micheline Misrahi

J Clin Endocrinol Metab. 2020 Jun 1;105(6):dgaa155. DOI: 10.1210/clinem/dgaa155

3.2 A Novel Phenotype Combining Primary Ovarian Insufficiency Growth Retardation and Pilomatricomas With MCM8 Mutation.

J Clin Endocrinol Metab. 2020 Jun 1;105(6):dgaa155. DOI: 10.1210/clinem/dgaa155

Les protéines MCM (*pour Mini chromosome Maintenance*) constituent un groupe de 10 protéines hautement conservées identifiées initialement comme étant impliquées dans la réplication de l'ADN (Maiorano *et al.*, 2006). Parmi ce groupe, MCM8 et MCM9 forment un hétérodimère (Figure 11) (Nishimura *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015; Weng *et al.*, 2022). En plus de son rôle dans la réplication de l'ADN, Cet hétérodimère est impliqué également dans la recombinaison homologue, la réparation des cassures double brin de l'ADN et également dans la réparation des mésappariements par le système MMR (MisMatch Repair) (Maiorano *et al.*, 2006; Nishimura *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015; Traver *et al.*, 2015). A ce jour, MCM8 et MCM9 sont les seuls impliqués en pathologie humaine (Wood-Trageser *et al.*, 2014; AlAsiri *et al.*, 2015; Huhtaniemi *et al.*, 2018a). En effet, deux publications ont rapporté l'implication de ces deux gènes dans des formes syndromiques d'IOP à partir de l'étude par exome de familles consanguines d'origine turque (Wood-Trageser *et al.*, 2014; AlAsiri *et al.*, 2015). Les mutations bi-alléliques de *MCM9* sont responsables d'IOP avec petite taille (AlAsiri *et al.*, 2015) alors que les mutations de *MCM8* ont été décrites dans une forme familiale d'IOP avec

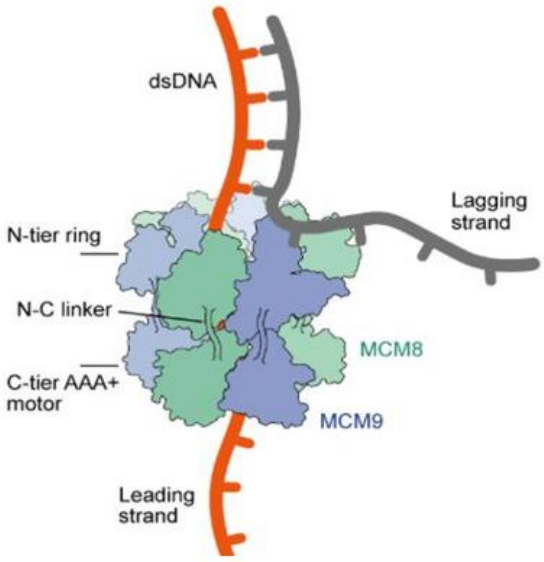


Figure 11 : Représentation schématique de l'hétérodimère MCM8-MCM9. Adapté de Weng et al., 2022.

hypothyroïdie (Wood-Trageser *et al.*, 2014). Par la suite, deux familles supplémentaires ont été décrites avec IOP non syndromique associée à une mutation homozygote de *MCM8* et deux familles avec une mutation homozygote de *MCM9* (Goldberg *et al.*, 2015; Tenenbaum-Rakover *et al.*, 2015; Fauchereau *et al.*, 2016; Bouali *et al.*, 2017).

Dans cet article, Nous avons décrit un nouveau phénotype associé à un variant tronquant bi-allélique de *MCM8* identifié par sequençage de l'exome dans une famille d'origine turque. Nous avons montré l'implication pour la première fois de ce gène dans des tumeurs dans l'espèce humaine : ici tumeurs cutanées bénignes ou pilomatricomes. Nous avons discuté l'impact de ce diagnostic dans la prise charge de la patiente et sa famille.

Il s'agit d'une patiente issue d'une famille consanguine d'origine turque née hypotrophe et vue pour la première fois à l'âge de 14 ans par une équipe d'endocrinologie en Belgique pour une petite taille à -4.3 DS, une microcéphalie à -3 DS, un retard pubertaire et une aménorrhée primaire. À l'âge de 13 ans, un dermatologue a diagnostiqué plusieurs pilomatricomes correspondant à des tumeurs bénignes dérivées des follicules pileux (Richet *et al.*, 2018). Les dosages hormonaux ont confirmé le diagnostic d'IOP avec des taux plasmatiques élevés de FSH (124 UI/l puis 73 UI/l), de LH (34UI puis 34UI/l), et un taux d'œstradiol bas (<5 pg/ml) et un très faible taux d'AMH (0,03 µg/l). L'échographie et l'IRM pelviennes ont révélé un petit utérus prépubère et des ovaires atrophiques sans follicule. A cet âge devant cette petite taille, un traitement par l'hormone de croissance (la GH) a été initié et poursuivi pendant 4 ans permettant une taille finale de 153 cm (-2,3 SD) (pour une taille cible 156,1 cm). En raison du lien potentiel entre les pilomatricomes multiples et le syndrome

de Gardner, une affection caractérisée par une polypose colique adénomateuse, nous avons recommandé une sigmoïdocoloscopie qui a été réalisée à l'âge de 22 ans et est revenue normale. Sur le plan familial, on note une IOP chez la mère de la patiente survenue à 29 ans, une hypothyroïdie puis un goitre multinodulaire traitée par chirurgie et enfin une maladie de Behçet comme son frère et deux sœurs dont une avait développé un cancer du sein à 46 ans.

En utilisant un séquençage de l'exome comparatif mère–fille, nous avons identifié un variant tronquant dans l'exon 9 du gène *MCM8* (c.925C>T ; p.Arg309Ter), homozygote chez la patiente et hétérozygote chez la mère. Nous avons démontré que les cellules lymphoblastoïdes dérivées de la patiente présentent des cassures chromosomiques avec des images radiales induites par la Mitomycine dix fois plus élevées en nombre par rapport à un témoin. Les cellules de la mère de la patiente présentent une fragilité intermédiaire entre celle de la patiente et du témoin.

Cette observation nous permet de discuter quatre points :

Sur le plan clinique : En plus de confirmer le phénotype endocrinien associé à des altérations bi-alléliques de *MCM8* et de *MCM9*, à savoir une aménorrhée primaire avec absence développement pubertaire et des ovaires atrophiques sans follicule, cette observation élargit le phénotype associé à *MCM8* à un retard de croissance intra-utérin (RCIU), une petite taille et surtout associé à des tumeurs dans l'espèce humaine. Après la publication de notre article, deux études ont établi un lien entre les variations de MCM8 et de MCM9 et la survenue de cancer colique (Golubicki *et al.*, 2020; Goldberg *et al.*, 2021). L'étude par exome d'une cohorte de 16 patients présentant un syndrome de lynch mais sans mutation identifiée dans les gènes

responsable de ce syndrome (*MLH1, MSH2, MSH6, PMS2* ou *EPCAM* ni méthylation somatique de *MLH1)* a permis d'identifier des variations bi-alléliques pathogènes de *MCM8* chez deux patients, un homme infertile et une femme avec IOP (Golubicki *et al.*, 2020). L'effet fonctionnel de ces variants a été démontré *in vitro* avec notamment une instabilité microsatellitaire (Golubicki *et al.*, 2020). De plus, la réévaluation clinique de 4 familles avec IOP et mutations bi-alléliques de *MCM9* a révélé que sur les 9 patients avec mutation bi-allélique de *MCM9*, un a développé un cancer colorectal et deux un cancer du col de l'utérus ou de l'ovaire (Goldberg *et al.*, 2021). Ceci est concordant avec le modèle murin même si le spectre des tumeurs est différent (Hartford *et al.*, 2011; Lutzmann *et al.*, 2012). En effet, les souris déficientes en *MCM8* ou *MCM9* ont développé des tumeurs ovariennes ou des carcinomes hépatocellulaires (Hartford *et al.*, 2011; Lutzmann *et al.*, 2012).

Sur le plan thérapeutique : Les enfants présentant une petite taille secondaire à un retard de croissance sévère sont souvent traités par l'hormone de croissance. Cependant, ce retard de croissance est une manifestation fréquente retrouvée dans les syndromes de cassure chromosomique comme le syndrome de Bloom ou dans l'AF (García-de Teresa *et al.*, 2017). Notre observation, confirme donc que les dommages d l'ADN, y compris induites par des altérations moléculaires de *MCM8* et de *MCM9*, peuvent se manifester par un retard de croissance intra-utérin et une petite taille. Dans ce cadre pathologique, le traitement par hormone de croissance est contre-indiqué car les patients ont un risque accru de développer un cancer à un plus jeune âge tout comme les autres gènes de réparation de l'ADN (syndrome de Bloom, AF,…). En effet, ce type de traitement par hormone de croissance peut stimuler la croissance des cellules malignes (Swerdlow *et al.*, 2017). Il est nécessaire d'effectuer une analyse

génétique de *MCM8* (et de *MCM9*) avant de commencer un traitement par hormone de croissance chez les adolescentes présentant une IOP avec une petite taille et un caryotype normal.

Sur le plan moléculaire et mécanistique : D'une façon intéressante cette observation permet également de corroborer les données moléculaires et fonctionnelles sur MCM8 souvent obtenues à partir des modèles murins ou *in vitro* dont la validation chez l'homme n'a pas encore été démontrée. La petite taille a déjà été décrite chez les patientes avec IOP et altérations bi-alléliques de MCM9 (Wood-Trageser *et al.*, 2014). Notre observation confirme indirectement la forte interaction entre MCM8 et MCM9 et est en faveur du fait que l'absence de l'une des deux protéines déstabilise le complexe MCM8-MCM9 et pourrait donc être responsable d'un phénotype similaire (Lutzmann *et al.*, 2012).Quatre patients atteints d'un déficit constitutionnel de réparation des mésappariements (CMMR-D), une maladie rare liée à des mutations germinales bi-alléliques dans les gènes de réparation des mésappariements (*MLH1, MSH2, MSH6 ou PMS2*), ont été décrits avec des pilomatricomes (Jasperson *et al.*, 2011; Chmara *et al.*, 2013; Richet *et al.*, 2018). Comme *MCM8* est également impliqué dans cette voie de réparation de l'ADN par le système MMR (Traver *et al.*, 2015), cela confirme que l'altération bi-allélique de cette voie de réparation de l'ADN peut être associée aux pilomatricomes. Inversement, MCM8 peut être impliqué dans la réparation d'ADN par la voie du système MMR chez l'homme. De plus, les pilomatricomes peuvent être associées au syndrome de Gardner, une forme rare de polypose colique. Le fait que notre patiente a développé des pilomatricomes et que les variations de MCM8 sont désormais impliquées dans les polypes du colon, permet de proposer que l'analyse génétique de MCM8 doit être

effectuée chez les patients avec un syndrome de Gardner notamment en présence de pilomatricomes.

Impact des variants hétérozygotes de MCM8 et MCM9 : L'implication des variants hétérozygotes de *MCM8* et de *MCM9* en pathologie humaine et en particulier dans l'IOP n'était pas clairement établie mème si une fragilité chromosomique intermédiaire chez les patientes porteuses hétérozygotes était déjà constatée et rapportée mais non associée à un problème de fertilité. Alors que les mères des patientes avec IOP et mutation bi-allélique de *MCM8* et de *MCM9* n'ont pas de problème de fertilité (Wood-Trageser *et al.*, 2014; AlAsiri *et al.*, 2015; Tenenbaum-Rakover *et al.*, 2015; Fauchereau *et al.*, 2016; Bouali *et al.*, 2017), le séquençage de *MCM8* et de *MCM9* dans une cohorte de plus de 150 patientes avec IOP a révélé des variants hétérozygotes probablement pathogènes de *MCM8* ou de *MCM9* chez 10 patientes (7%) (Desai *et al.*, 2017). Dans notre observation, la mère de la patiente, hétérozygote pour la mutation p.Arg309Ter, a développé une aménorrhée secondaire à l'âge de 29 ans et a également une fragilité chromosomique intermédiaire entre celle de la patiente et d'un contrôle en présence de la MMC. Cette discordance de l'impact des variants hétérozygotes pathogènes de MCM8 ou de MCM9 rapportés à ce jour peut être expliquée par la présence d'autres facteurs pouvant influencer la fonction ovarienne de ces patientes. En effet, la mère de notre patiente présentait une hypothyroïdie liée à une thyroïdite auto-immune et à la maladie de Behçet traitée par la Colchicine. En effet, ces facteurs, en particulier l'auto-immunité, pourraient avoir jouer un rôle additif pour altérer la fonction ovarienne. On peut donc proposer une corrélation génotype-phénotype entre les altérations moléculaires de MCM8/MCM9 et l'IOP. A l'état homozygote, les variants pathogènes de ces gènes sont responsables

d'une IOP avec une aménorrhée primaire isolée ou syndromique alors qu'à l'état hétérozygote, ils peuvent être à l'origine d'une aménorrhée secondaire notamment en présence d'autres facteurs environnementaux. De plus, Les données actuelles de la littérature suggèrent l'existence d'un risque modéré de cancer colorectaux chez les porteurs hétérozygotes de *MCM8* et *MCM9* (Goldberg *et al.*, 2015; Golubicki *et al.*, 2020).En effet, dans l'étude de Goldberg et ses collaborateurs, parmi les 7 porteurs hétérozygotes de *MCM9* pour qui une coloscopie a été réalisée , 2 ont développé un cancer colorectal (âgé 35 ans et 83 ans) et 6 (âgé de 39 à 83 ans) ont développé quelques polypes coliques (Goldberg *et al.*, 2021).

Enfin, dans notre grande cohorte publiée récemment (Heddar *et al.*, 2022b) (cf. plus loin), nous avons identifié 1 variant homozygote de *MCM8* chez deux patientes présentant une aménorrhée primaire. D'une manière intéressante, nous avons confirmé l'implication du variant homozygote de *MCM9* (p.Arg132Ter) identifié initialement dans une forme syndromique d'IOP chez une patiente également d'origine Turque mais présentant une IOP isolée (sans petite taille contrairement à l'observation initiale) (AlAsiri *et al.*, 2015). Ceci confirme la variabilité phénotypique associée aux mutations de *MCM8* et de *MCM9*. Avec l'ensemble des patientes rapportées à ce jour, on compte pour *MCM8* : 10 variants (5 faux-sens, 3 troncatures et deux variants d'épissage) décrits chez 22 patientes à l'état homozygote ou hétérozygote composite (AlAsiri *et al.*, 2015; Tenenbaum-Rakover *et al.*, 2015; Bouali *et al.*, 2017; Jolly *et al.*, 2019; Heddar *et al.*, 2020a; Wang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020; Heddar *et al.*, 2022b; Tucker *et al.*, 2022a). Concernant *MCM9*, on compte à ce jour 14 variants (3 faux-sens, 9 troncatures et deux variants d'épissage) décrits chez 18 patientes à l'état homozygote ou hétérozygote composite (Wood-Trageser *et al.*, 2014; Goldberg *et al.*,

2015; Fauchereau *et al.*, 2016; Desai *et al.*, 2017; Jolly *et al.*, 2019, 2019; Yang *et al.*, 2019a; Alvarez-Mora *et al.*, 2020; França *et al.*, 2020; Goldberg *et al.*, 2021) .De plus le gène *MCM8* a été également impliqué dans l'infertilité masculine dans deux familles non-apparentées (Tenenbaum-Rakover *et al.*, 2015; Kherraf *et al.*, 2022). Les hommes avec inactivation bi-allélique de *MCM8* présentent une azoospermie non obstructive (Tenenbaum-Rakover *et al.*, 2015; Kherraf *et al.*, 2022).

Au total : Les altérations bi-alléliques de MCM8 et son partenaire MCM9 confèrent une fragilité chromosomique et sont responsables d'un spectre phénotypique large allant d'une IOP isolée à des formes syndromiques associant RCIU, petite taille, hypothyroïdie et tumeurs cutanées ou coliques ou bien d'une infertilité masculine (pour MCM8 actuellement). Elles doivent être évoquées puis recherchées chez les patientes présentant une IOP et petite taille avec ou sans pilomatricomes avant la prescription de l'hormone de croissance. Les femmes porteuses de variants hétérozygotes sont à risque de développer une IOP notamment en présence d'autres facteurs environnementaux. Un conseil génétique adapté avec une préservation de la fertilité pour les porteuses hétérozygotes et une surveillance à long terme sont recommandés en présence d'une altération moléculaire de MCM8 ou de MCM9.

A Novel Phenotype Combining Primary Ovarian Insufficiency Growth Retardation and Pilomatricomas With MCM8 Mutation

Abdelkader Heddar,[1] Dominique Beckers,[2] Baptiste Fouquet,[1] Dominique Roland,[3] and Micheline Misrahi[1]

[1]Universités Paris Sud, Paris Saclay, Faculté de Médecine; Unité de Génétique Moléculaire des Maladies Métaboliques et de la Reproduction, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Hôpital Bicêtre AP-HP, 94275, Le Kremlin-Bicêtre, France; [2]Université catholique de Louvain, CHU UCL Namur, Pediatric Endocrinology, 5530 Yvoir, Belgium; and [3]Centre de Génétique Humaine, Institut de Pathologie et de Génétique, 6041 Gosselies, Belgium.

ORCiD number: 0000-0002-5379-8859 (M. Misrahi).

Context: Primary Ovarian insufficiency (POI) affects 1% of women aged <40 years and leads most often to definitive infertility with adverse health outcomes. Very recently, genes involved in deoxyribonucleic acid (DNA) repair have been shown to cause POI.

Objective: To identify the cause of a familial POI in a consanguineous Turkish family.

Design: Exome sequencing was performed in the proposita and her mother. Chromosomal breaks were studied in lymphoblastoid cell lines treated with mitomycin (MMC).

Setting and patients: The proposita presented intrauterine and postnatal growth retardation, multiple pilomatricomas in childhood, and primary amenorrhea. She was treated with growth hormone (GH) from age 14 to 18 years.

Results: We identified a novel nonsense variant in exon 9 of the minichromosome maintenance complex component 8 gene (*MCM8)* NM_001281522.1: c0.925C > T/p.R309* yielding either a truncated protein or nonsense-mediated messenger ribonucleic acid decay.

The variant was homozygous in the daughter and heterozygous in the mother. MMC induced DNA breaks and aberrant metaphases in the patient's lymphoblastoid cells. The mother's cells had intermediate but significantly higher chromosomal breaks compared with a control.

Conclusion: We describe a novel phenotype of syndromic POI related to a novel truncating *MCM8* variant. We show for the first time that spontaneous tumors (pilomatricomas) are associated with an MCM8 genetic defect, making the screening of this gene necessary before starting GH therapy in patients with POI with short stature, especially in a familial or consanguineous context. Appropriate familial monitoring in the long term is necessary, and fertility preservation should be considered in heterozygous siblings to avoid rapid follicular atresia. (***J Clin Endocrinol Metab*** **105: 1–10, 2020)**

Key Words: Primary ovarian insufficiency, MCM8, chromosomal breakage syndrome, fertility preservation, growth hormone therapy, pilomatricoma

Abbreviations: BAM, binary alignment map; CADD, combined annotation dependent depletion; CGH array, comparative genomic hybridization array; DNA, deoxyribonucleic acid; EBV, Epstein-Barr virus; FSH, follicle-stimulating hormone; GH, growth hormone; IGV, integrative genomics viewer; IUGR, intrauterine growth retardation; LH, luteinizing hormone; M-CAP, mendelian clinically applicable pathogenicity score; MAF, minor allele frequency; MCM, minichromosome maintenance; MCM8, MCM complex component 8 gene; MMC, mitomycin; MMR, mismatch repair; mRNA, messenger ribonucleic acid; NMD, nonsense-mediated mRNA decay; POI, primary ovarian insufficiency; SD, standard deviation; SGA, small for gestational age; SIFT, sorting intolerant from tolerant; T4, thyroxine; TPO, thyroid peroxidase; TSH, thyroid stimulating hormone; WES, whole exome sequencing.

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in USA
© Endocrine Society 2020. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com
Received 9 October 2019. Accepted 1 April 2020.
First Published Online 2 April 2020.
Corrected and Typeset 29 April 2020.

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/105/6/dgaa155/5815316 by JEPU ProfCORIAT user on 04 May 2020

Primary ovarian insufficiency (POI) is characterized by amenorrhea or oligomenorrhea >4 months with follicle-stimulating hormone (FSH) ≥ 25 IU/L in women aged <40 years. Although many iatrogenic (chemotherapy, surgery, or irradiation), autoimmune, or viral factors can cause POI, more than 70% of cases remain idiopathic. It is estimated that one-third of unexplained POI could be of genetic origin. There is a high genetic heterogeneity with more than 60 genes involved to date (1). They are implicated in the establishment of the ovarian reserve, in follicular growth, or in follicular atresia. Recent advances and especially whole exome sequencing (WES) have recently highlighted a role for meiosis and deoxyribonucleic acid (DNA) repair genes in POI, previously suspected from animal models. Indeed 15 of 21 POI genes identified by WES in the last 5 years are meiosis or DNA repair genes (2-16). However, these genes have been identified most often in single or rare families (2-16). Obviously, more patients need to be studied to describe the phenotypic spectrum of POI associated with specific gene defects.

Extrareproductive features of syndromic POI are important to evaluate because they need an adapted medical care such as with sensorineural deafness in Perrault syndrome, neonatal jaundice, failure to thrive in galactosemia, cardiopathy, and short stature in the classical Turner syndrome (1). For the latter condition, the use of growth hormone (GH) therapy is indicated in the presence of intrauterine growth retardation (IUGR) and short stature. However, care should be taken to ensure that the use of this therapy in patients with POI and short stature does not produce adverse effects when specific causes are involved such as in chromosomal breakage syndromes (17).

In this study, we describe in a consanguineous Turkish family with a novel phenotype of POI with primary amenorrhea and impuberism, including intrauterine and postnatal growth retardation and multiple pilomatricomas in childhood, associated with a nonsense variant of a DNA repair gene, *MCM8*. This is the first case of tumors observed in humans with *MCM8* variants. This observation makes the screening of this gene necessary before GH therapy, especially in familial or consanguineous POI. A long-term follow-up is needed. Fertility preservation should be proposed in heterozygous siblings to avoid rapid follicular atresia.

Patients and Methods

Clinical data and medical history

The pedigree of this Turkish consanguineous family is illustrated in Figure 1. The parents (III.1 and III.2) are first cousins connected by at least 2 consanguineous weddings (Fig. 1A). The proband IV.2 was investigated in Belgium at the age of 14 years for small stature, lack of pubertal development, and primary amenorrhea. She was born at 40 weeks of gestation after IUGR. At birth, she weighed 2450 g (–2.6 standard deviation [SD]) with a height of 45 cm (–2.9 SD). The first years of life were unremarkable except for hypotrophy and recurrent otitis that necessitated adenoidectomy and ear tube insertion at 7 years of age. She had no psychomotor developmental delay. At the age of 13 years, the dermatologist diagnosed multiple pilomatricomas (Fig. 2). She was also referred to an endocrinologist and a clinical geneticist to investigate the persistence of small-proportionated stature and late puberty with questions about the etiology, GH therapy, and pubertal induction. The auxological parameters were height of 133 cm (–4.3 SD), head circumference of 50 cm (–3.2 SD), weight of 24.4 kg (–5.7 SD), body mass index of 13.9 kg/m^2 (–2.9 SD), and growth velocity of 2.8 cm/year (based on growth Turkish data) (18). The Tanner score was A1P1M1 with primary amenorrhea. She had a 3-year bone age delay. Hormonal assays revealed high FSH (124 IU/L) and luteinizing hormone (LH) (34 IU/L) levels and low estradiol (<5 pg/mL) plasma levels. POI was diagnosed. Prolactin, cortisol, and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) plasma levels were normal. Pelvic ultrasonography and magnetic resonance imaging revealed a small prepubertal uterus and streak ovaries (right 14 mm and left 10 mm) without follicles. Anti–thyroid peroxidase (TPO) antibodies were slightly elevated at this stage (37 IU/L at age 14 years, normal range < 34 IU/L) with normal thyrotropin (TSH) and thyroxine (T_4) plasma concentrations. A second blood assay at the age of 19 years confirmed high FSH and LH levels (73 IU/L and 34 IU/L, respectively) and a very low anti-müllerian hormone (0.03 µg/L) level. TSH and T_4 levels were normal (see Table 1). Ovarian and adrenal antibodies were negative. IGF-1 plasma levels were within normal ranges: 278 [213-654] ng/mL. The karyotype was 46,XX, and *FMR1* premutation screening was negative. Array CGH (180K) was normal. At age 14 years, she started a GH therapy for persistent small stature after IUGR. GH therapy was initiated at a dose of 0.03 mg/kg/day and continued for 4 years. Pubertal induction was started at age 15 years, with good response. Her final height after treatment is 153 cm (–2.3 SD; target height 156.1 cm), identical to her mother. Because of the potential link between multiple pilomatricomas and Gardner syndrome, a condition characterized by adenomatous colonic polyposis, we performed a sigmoidocolonoscopy at the age of 22 years, which precluded diagnosis in the absence of a polyp.

The older sister of the proband is healthy. She was also born small for gestational age (SGA) (weight 2500 gr [–2.5 SD] and height 47 cm [–2.5 SD]). She had menarche at the age of 11 years, with normal puberty. She is currently 21 years old with a height of 150 cm (–2.4 SD) in the context of familial short stature and has no health problem. Blood and hormonal assays at the age of 22 years in another center revealed no abnormalities especially for FSH, LH, TSH, and T_4 plasma assays and anti-TPO, anti–21-hydroxylase, and ovarian antibodies were negative.

The patient's mother (III.1) has a height of 153 cm (–2.2 SD) (body mass index [BMI] 25.7 kg/m^2) and head circumference of 56 cm (0 SD). She did not originate from a consanguineous marriage. She had 2 pregnancies at ages 24 and 25 years in Turkey. Cessation of menses occurred 3 years after the last pregnancy at the age of 28 years. She

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/105/6/dgaa155/5815316 by JEPU ProfCORIAT user on 04 May 2020

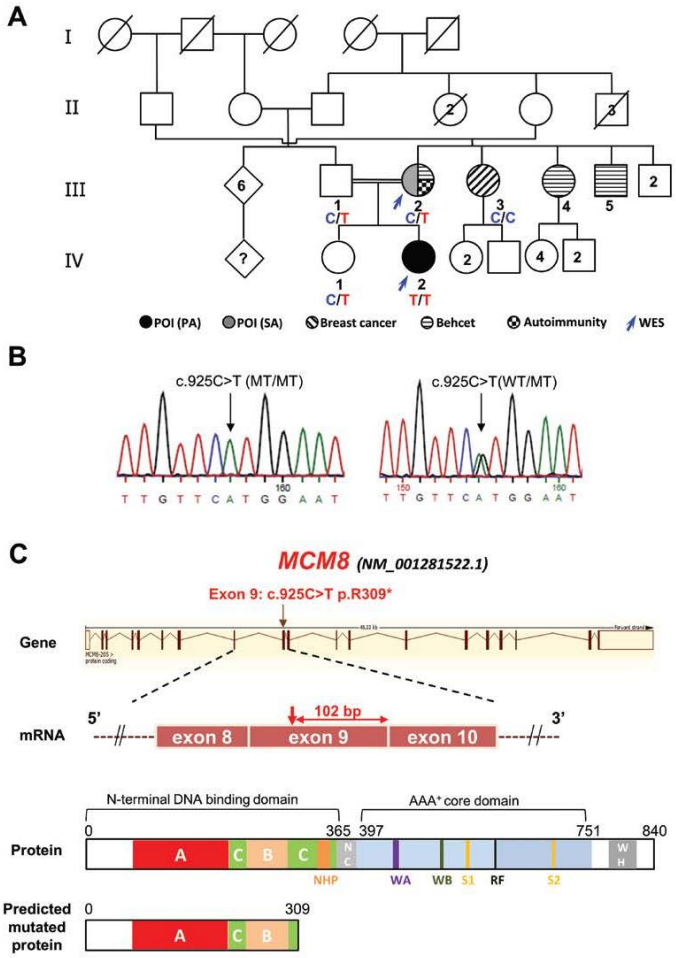


Figure 1. Pedigree of the family with *MCM8* pathogenic variant and molecular analysis. A) Pedigree of the family. Double lines indicate consanguineous unions. The proband and the mother (blue arrows) were analyzed by whole exome sequencing (WES). The genotypes of *MCM8* are indicated: normal wild type (WT) allele C in blue, mutated allele T in red. MCM8, minichromosome maintenance complex component 8; POI, primary ovarian insufficiency. B) Sanger sequencing electropherograms showing the heterozygous (on the left) and homozygous (on the right) MCM8 variant. MT, mutated; WT, wild type. C) Structure of the MCM8 gene, mRNA, and protein and position of the variant. The structure of the region of the transcript surrounding the variant and of the normal protein are shown below the genomic structure, the coding exons represented as colored rectangles (references NM: 001281522.1). According to the "50-bp rule" (26), the pathogenic variant can cause degradation of the corresponding mRNA if it is more than 50 bp upstream from the 3'exon-exon junction. Alternatively, this variant may yield a truncated protein devoid of the 531 C-terminal residues (predicted mutated protein). The different domains are indicated: NHP, N-terminal hairpin; WA, walker A; WB, walker B motifs for ATP hydrolysis; S1, sensor 1; S2, sensor 2; RF, arginine finger; WH, winged helix; N-C N-terminal to C-terminal linker, A, B, and C structural domains. mRNA, messenger ribonucleic acid.

was investigated in Belgium at age 39 years. Hormonal assays confirmed the diagnosis of POI with high FSH (36.3 IU/L) plasma concentration. LH (23 IU/L) plasma level was high and anti-müllerian hormone was low (0.03µg/L). She reported being diagnosed with hypothyroidism at age 12 years in Turkey. A treatment was started, but medication adherence was poor, and she stopped medication, showing no symptoms since the age of 22 years. All TSH and T_4 levels available from age 34 to 46 years were within normal ranges. There were persistent high levels of anti-TPO antibodies (145 IU/mL; normal < 30 IU/mL) (see Table 1). At the age of 46 years, a total thyroidectomy was performed due to a multinodular goiter, and histology confirmed benign lymphocyte thyroiditis. The mother also suffered from Behcet disease and was treated for 1 year with colchicine at age 34 years. One brother (III.5) and 2 sisters (III.3 and III.4) also developed Behcet disease. In addition, her sister III.3 was treated at the age of 46 years for breast cancer with a good clinical outcome.

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/105/6/dgaa155/5815316 by JEPU ProfCORIAT user on 04 May 2020

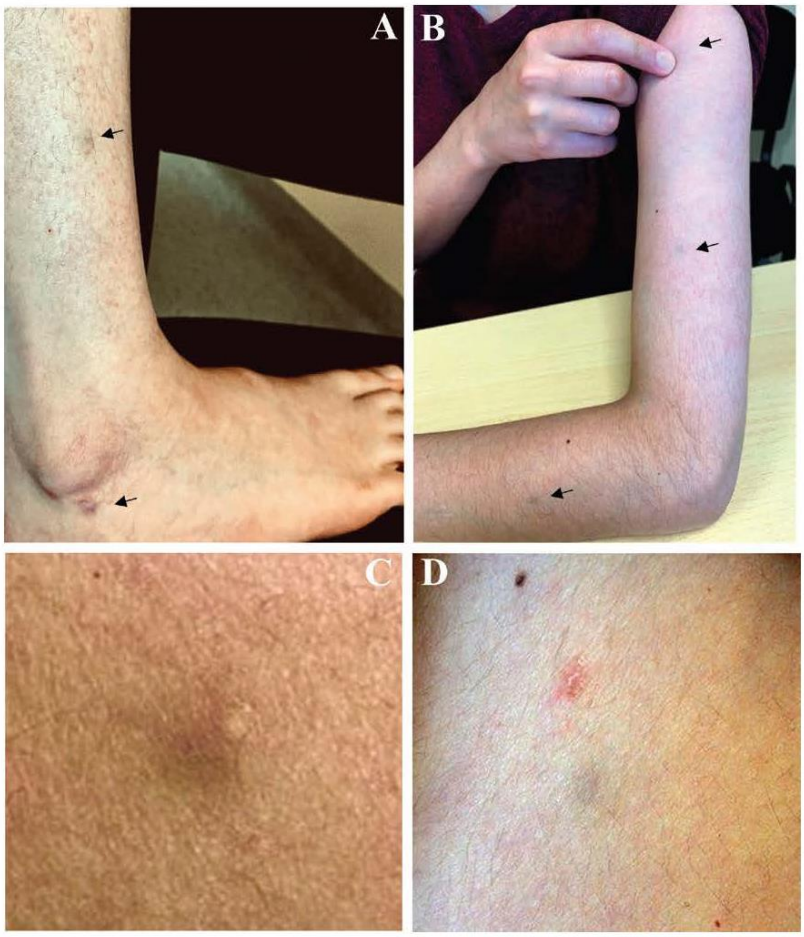


Figure 2. Pilomatricomas in the proposita. Pilomatricomas appear as papular, palpable bluish lesions. A and C: leg and foot. B and D: arm and forearm.

WES and homozygosity mapping

Exome analysis was performed on genomic DNA extracted from the peripheral blood of the proposita (IV.2) and her mother (III.2). Library preparation, exome capture, sequencing, and data processing were performed by IntegraGen SA (Evry, France) according to their in-house procedures (10). Data analysis was performed as described in heddar et al (19). Briefly, exon enrichment was performed on 600 ng of DNA, using the Agilent SureSelect Human All Exons kit version CRE (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Exon-enriched libraries were subjected to a 75 bp paired-end sequencing on a HiSeq2500, according to the manufacturer's protocol. Reads alignment to the human reference genome (GRCh38) and variant calling were performed using the Illumina pipeline (CASAVA 1.8.2). Variant annotation was performed using the Ensembl Variant Effect Predictor Tools. The variants were filtered using SIRIUS, an IntegraGen in-house pipeline platform. Homozygosity mapping of the proband and her mother using HomozygosityMapper was performed (20).

Sanger genomic sequencing

Relevant pathogenic variant detection was confirmed by direct genomic Sanger sequencing of *MCM8* using the followings pair of primers:

5'-TTGCAGAAACCATCCAAAGTAAGT-3'
5'-GAGGTTCAGGAGCATCTTAGAAA-3'

Chromosome breakage analysis

To confirm the functional impact of the *MCM8* nonsense variant, we performed chromosomal breakage studies. Epstein-Barr virus (EBV)–immortalized lymphoblastoid cell lines derived from the patient, her mother, and a healthy woman as control were established at the Institute of Pathology and Genetics, Gosselies, Belgium, following a standard in-house protocol. EBV-immortalized cells were cultured under standard conditions for karyotyping. DNA damage was induced using mitomycin C (MMC, Sigma) added for 72 hours according to the in-house protocol of the laboratory specialized in the diagnosis of Fanconi anemia in our University (Department of Medical Biology and Pathology, Gustave Roussy, Villejuif,

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/105/6/dgaa155/5815316 by JEPU ProfCORIAT user on 04 May 2020

Table 1. Clinical and Biological Studies of the POI Family

Case	Cycles	Age at Evaluation (Years)	BMI (kg/m²) (Height cm/ weight kg)	HC cm (SD)	FSH IU/L	LH IU/L	E2 ng/L	AMH µg/L	InhB ng/L	T nmol/L	17OHP ng/mL	D4 (ng/dL)	DHEA (µg/dL)	PRL ng/mL	TSH mU/L	T4 pmol/L	Anti-TPO IU/mL	Ovarian surface Size R/L (mm)
Proposita	PA	14	14.1 (133/25)	50 (-3)	110.5	23	-	<0.1	<10	0.17	0.18	-	85	-	0.889	16.2	37	not visualized
		15			106	31.6	<5	<0.1	<9.5	0.10		30	104	7.7	1.54	15.8	45	10/14
		21	-	-	59.5	26.6	120	<0.1	-	-	0.40	-	-	-	1.85	15.1	142	-
Sister	Regular menses	22	20.5 149.3/45.7	55 (0)	4.7	5.8	142	1.1	163	0.55	0.66	-	199	19.5	1.51	14.8	<1	-
Mother	SA (29 years)	39	25.7 153.5/60.3	56 (0)	36.3	23.3	74	<0.03	<0.1	<0.69	<30	<30	47	6.92	0.63	16.7	145	18/27

Normal plasma values: AMH: 2.2-6.8 ng/mL; testosterone: 0.4-2 nmol/L; 17OHP: 10-100 ng/dL; D4: 40-410 ng/dL; DHEA: 35-430 ng/dL; PRL: 0.7-25 ng/mL; TSH: 0.3-4.2 mU/L; inhibine B: 10-320 ng/L; T_4: 11.5-22.7 pmol/L; anti-TPO antibodies: N < 35 IU/mL. Respectively, follicular, ovulatory, luteal phases and menopause: FSH (IU/L): (2.9-12), (6.3-24), (1.5-7), (17-95); LH: (IU/L) (1.5-8), (9.6-80), (0.2-6.5), (8-33); E2 (ng/L): (19.5-144.2), (63.9-356.7), (55.8-214.2), (≤ 32.2).

Abbreviations: 17OHP, 17 hydroxyprogesterone; AMH, anti-müllerian hormone; BMI, body mass index; D4, delta4 androstenedione; DHEA, dehydroepiandrosterone; E2, estradiol; FSH, follicle-stimulating hormone; HC, head circumference; InhB, inhibine B; LH, luteinizing hormone; P, progesterone; PA, primary amenorrhea, PRL, prolactin; SA, secondary amenorrhea; T, testosterone; T_4, thyroxine; TPO, thyroid peroxidase; TSH, thyrotropin; US, ultrasonography.

France) (10). For each sample, 3 conditions were tested: without MMC (to analyze spontaneous damage), with 10^{-7} M MMC, and with 10^{-6} M MMC. Chromosomal breakages and rearrangements were scored by an experiment cytogeneticist on at least 20 metaphases.

Results

Exome sequencing and Sanger sequencing results

Exome sequencing was performed on peripheral blood DNA from patient IV.2 and III.2, her mother (Fig. 1A). All exome metrics are summarized in Table 2. Briefly, across the 2 exomes, we obtained an average of 6 Gb of sequences with more than 99% of mappable reads and a mean depth of 75x. More than 90% of bases were covered to a minimum depth of 25x, and the Q score was above 30 for most reads (>95%). First, variants with coverage less than 5x and/or Q score below 20 were filtered out. Then, variations were filtered in the last updates of the following human variation database using a minor allele frequency (MAF) of 1%: 1000 Genomes; ExAC, EVS and GnomAD (exome and Genomes). In this consanguineous family, a recessive genetic transmission was expected with pathogenic variants homozygous in the patient and heterozygous in the mother. Among a total of a 45212 variants sequenced with a coverage of at least 5X, 111 have an MAF < 1%, are located in coding sequences or in splicing regions, fit the criteria of pathologic variant using in silico prediction tools with Varsome website, and fulfill an autosomal recessive transmission (Table 3 and in heddar et al (21) among the 111 variants, 36 variants can be excluded because of their presence in our control in-house database of fertile women. Of the 75 remaining variants, 31 are synonymous variants without impact on splicing, and 28 correspond to false positives by careful examination of the BAM. Five out of the 16 variants are ruled out with M-CAP and CADD scores. Therefore, the 11

Table 2. Whole Exome Sequencing Metrics in the Family With *MCM8* Mutation

WES Metrics	Mother (III0.2)	POI (IV0.2)
Gbases	6.4	5.6
Number of reads (millions)	9.6	8.4
% Alignment	99.2	99.3
% Mismatch rate R1	0.16	0.16
% Mismatch rate R2	0.37	0.35
% ≥Q30 bases	95.5	95.6
Mean quality score	39	39
Mean depth (X)	77.7	72.1
% of bases covered at 25X	92.6	90.8

Abbreviations: POI, primary ovarian insufficiency; WES, whole exome sequencing.

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/105/6/dgaa155/5815316 by JEPU ProfCORIAT user on 04 May 2020

Table 3. Whole Exome Sequencing Variant Filtering in the Family With *MCM8* Mutation

Variant Filters	Number of Variants
Filter "PASS"	45515
Minimum depth at variant ≥ 5	45212
Homozygous in patient and heterozygous in mother	5381
In protein coding gene	2236
In coding sequence or splice	2005
MAF < 1% (ExAC)	111
Not homozygous in fertile controls	75
Not synonymous	44
Careful examination with IGV	16
CADD > 20, MCAP > 0.025	**11**

Abbreviations: CADD, combined annotation-dependent depletion; ExAC, variant database; IGV, integrative genomics viewer; MAF, minor allele frequency; MCAP, Mendelian clinically applicable pathogenicity; PASS, variants with satisfactory Next Generation Sequency quality criteria (Q score > 20).

remaing variants are detailed in heddar et al (21). The only relevant gene with a deleterious impact variant and a known role in ovarian function according to existing animal model and pathophysiology in humans is the *MCM8* variant. There is no other homozygous pathogenic variant in another gene in tandem that could explain the patient's extraovarian phenotype (intrauterine growth retardation, small stature, and pilomatricomas). The *MCM8* variant was a nonsense variant in exon 9 of *MCM8* (NM_001281522.1:c0.925C > T), yielding either a truncated protein p.R309* deleted of the last 531 residues of *MCM8* or a degradation of the corresponding transcript by a nonsense-mediated mRNA decay (NMD) (Fig. 1b and 1c). This nonsense variant was recorded in dbSNP as rs201115244. It was absent in all population variant databases (1000 Genomes Project, ESP6500, ExAC) but was reported in one male and one female at the heterozygous state in the GnomAD data base. The MAF was of 8.13e-5 (2/246146 alleles).

Sanger genomic sequencing in the family confirmed the presence of the nonsense variant (c0.925C > T; p. Arg309*), homozygous in the patient and heterozygous in both parents. The healthy older sister was heterozygous for the allelic variant. The maternal aunt (III.3) who developed breast cancer inherited both wild-type alleles (Fig. 1A).

Autozygosity mapping has been performed in the patient and her mother using HomozygosityMapper (20). As shown in heddar et al (21), various homozygous regions can be highlighted in several chromosomes in the patient, with MCM8 being located on chromosome 20. By contrast, no homozygous regions are found in the mother except in chromosome 4, with a low score and not shared in her daughter (21). Furthermore, as shown in heddar et al (21), no relevant homozygous pathogenic variant could be detected in the mother. This confirms that the mother does not originate form a consanguineous marriage and excludes a pseudodominance mode of inheritance.

Chromosomal instability studies

EBV-immortalized cell lines derived from the patient, her mother, and a healthy control were exposed to MMC to study chromosomal instability. No spontaneous chromosomal breakage was observed in the 3 samples in the absence of MMC. At 10^{-7} M MMC, few breakages were observed in the patient's cells but not in the mother's cells and the control's cells. At 10^{-6} M, the patient's cells showed 2 times more breaks per cell when compared with her mother's cells. The mother's cells exhibited 5 times more breaks per metaphase when compared with the control's cells. Furthermore, more aberrant metaphases were observed in the patient's cells compared with her mother's cells and with the control's cells. (Fig. 3A).

Discussion

Recent advances in the genetics of POI with the use of WES have highlighted a growing role for meiosis and DNA repair genes, including *MCM8/9* (6, 7). However, these genes have been identified most often in single or rare families. Minichromosome maintenance (MCM) proteins are a group of 10 highly conserved proteins involved in DNA replication (22). MCM8 and MCM9 form a heterodimer that has an important role in DNA replication, homologous recombination, DNA double-strand break repair, and also has recently been implicated in mismatch repair (MMR) (22–25).

In the present study, we identified by WES a novel nonsense (c0.925C > T; p.R309*) variant in exon 9 of the *MCM8* gene in a Turkish consanguineous family with POI. This novel variant may yield a truncated protein deleted of the 531 C-terminal residues or a degradation of the corresponding mRNA by NMD. According to the "50-bp rule" established in 1998 (26) and confirmed by large transcriptomic analysis in humans (27), the aberrant mRNA should undergo NMD if the stop codon is located more than 50 to 55 nucleotides upstream of the 3'exon-exon junction. As shown in Figure 1, the nonsense variant of *MCM8* detected in our patient is located 102 bp upstream of the exon 9/exon10 junction. Therefore, it is very likely that the aberrant transcript would be degraded by NMD.

In our study, we show that EBV-derived lymphoblastoid cells from the proband exhibited higher MMC-induced breaks per cell with complex rearrangements when compared with a control. These findings

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/105/6/dgaa155/5815316 by JEPU ProfCORIAT user on 04 May 2020

A

	Aberrant Metaphase			Breaks/ Metaphase			Breaks/ Aberrant Metaphase		
	Untreated	10^{-7}M	10^{-6}M	Untreated	10^{-7}M	10^{-6}M	Untreated	10^{-7}M	10^{-6}M
POI Patient	0/50	4/50 (4%)	**15/19 (79%)**	0/50	4/4 (1)	**40/19 (2.11)**	0/50	4/4(1)	**40/5(2.66)**
Mother	0/50	2/50 (2%)	**13/19 (68%)**	0/50	2/2 (1)	**20/20 (1)**	0/50	2/2(1)	**20/13(1.54)**
Control	0/50	1/50 (1%)	**3/19 (16%)**	0/50	1/1(1)	**4/19 (0.211)**	0/50	1/1(1)	**4/3(1.33)**

B

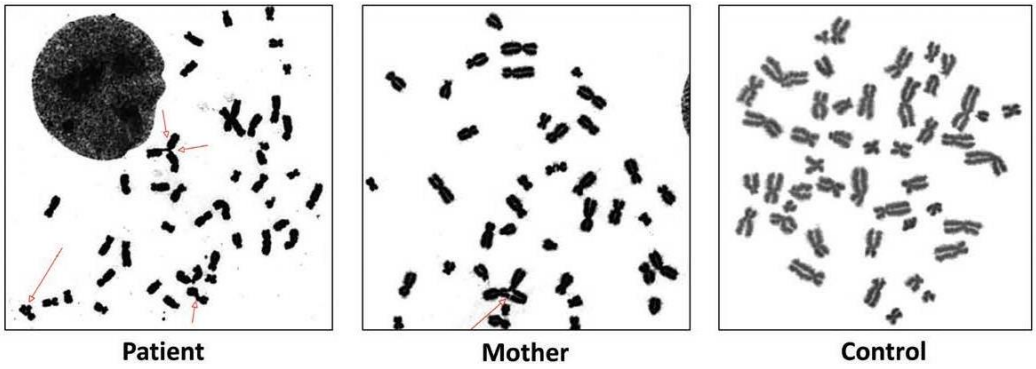


Figure 3. Chromosomal instability studies. (A) Spontaneous and mitomycin C-induced chromosomal breakage in lymphoblastoid cell lines from the patient, her mother, and a healthy control. A minimum of 20 metaphases were scored for each sample. (B) Examples of MMC-treated metaphases from the patient, her mother, and a control with 10^{-6} M MMC. Arrows indicate breaks and chromosomal rearrangements. MMC, mitomycin; POI, primary ovarian insufficiency.

support a causative role for the *MCM8* variant in the POI of the proband.

Until now, 4 *MCM8* biallelic homozygous pathogenic variants impairing MCM8 function have been described in 3 consanguineous families (7, 28, 29). In all cases, the phenotype described was primary amenorrhea with lack of pubertal development. When available (2/3 cases), ultrasonography revealed an infantile uterus with streak gonads. MMC-induced chromosomal instability was found in cells derived from the patients (7, 28, 29). The reproductive phenotype in our patient is in line with the previously reported patient with primary amenorrhea lack of pubertal development, and streak ovaries. In one family, hypothyroidism was noted (7). However, the main difference with previous observations is that our patient had a syndromic POI, including small stature and multiple pilomatricomas. Interestingly, in families harboring MCM9 pathogenic variants (6, 30, 31) syndromic POI with short stature was also observed (6). Since MCM8 and MCM9 form a stable complex and the absence or low concentration of 1 of the 2 partners destabilizes the heterodimer (32), similar functional consequences are expected. The birth weight of the older sister is 2500 g according to the mother, and therefore she could be considered born small for gestational age. However, we have no information on the exact term of pregnancy in Turkey and no medical information could be obtained. Furthermore, the postnatal growth of the sister was normal as her final height is similar to her mother's (153 cm). On the contrary, the patient has a growth curve lower than that of her sister, and she catches up to the familial height only after GH therapy and pubertal induction. It is known that short stature is associated with other DNA repair disorders and especially with POI with MCM9 defects (6). Furthermore, our patient developed multiple pilomatricomas in childhood. Those are benign tumors derived from hair follicles, either isolated or in multiple forms (33). Multiple pilomatricomas are often associated with other syndromes such as Gardner or Turner syndromes (33-35). We ruled out both affection with normal karyotype and rectosigmoidoscopy, in addition to a careful examination of all *APC* variants detected in the patient (Table 4). Interestingly, constitutional mismatch repair deficiency, a rare disease related to biallelic germline mutations in MMR genes (*MLH1, MSH2,MSH6 or PMS2*), was described in 4 patients

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/105/6/dgaa155/5815316 by JEPU ProfCORIAT user on 04 May 2020

Table 4. Variants in *APC* Detected by Whole Exome Sequencing in the Patient and Her Mother (NM_000038.5)

Genomic Position (hg38)	Ref	Var	SNP Reference	Type	cDNA	Protein	Mother	Patient	SIFT	PolyPhen	1000G MAF	ExAC MAF
chr5:112839543	G	C	rs1801166	Missense	c0.3949G > C	E1317Q	GG	GC	Tolerated (0.06)	Benign (0.009)	0.0030	0.004126
chr5:112841059	T	A	rs459552	Missense	c0.5465T > A	V1822D	AA	AA	Tolerated low Confidence (0.5)	Benign (0)	0.1346	0.798
chr5:112827157	T	C	rs2229992	Synonymous	c0.1458T > C	Y486Y	TC	TC	.	.	0.4900	0.577
chr5:112828864	G	A	rs351771	Synonymous	c0.1635G > A	A545A	GA	AA	.	.	0.3339	0.648
chr5:112840073	G	A	rs41115	Synonymous	c0.4479G > A	T1493T	GA	AA	.	.	0.3345	0.648
chr5:112840628	G	A	rs42427	Synonymous	c0.5034G > A	G1678G	GA	AA	.	.	0.3333	0.650
chr5:112840859	G	A	rs34506289	Synonymous	c0.5265G > A	A1755A	GG	GA	.	.	0.0042	0.004472
chr5:112840862	T	G	rs866006	Synonymous	c0.5268T > G	S1756S	TG	GG	.	.	0.3331	0.650
chr5:112841474	G	A	rs465899	Synonymous	c0.5880G > A	P1960P	GA	AA	.	.	0.3335	0.648
chr5:112783896	A	G	rs111933129	Intronic	c0.645 + 2993A > G	.	AG	AG	.	.	0.0246	.
chr5:112822734	G	A	rs2545162	Intronic	c0.1408 + 743G > A	.	GA	AA	.	.	0.3209	.

Frequency of each variant in 1000 Genomes (1000G) and ExAC databases is reported.
Abbreviations: cDNA, complementary deoxyribonucleic acid; MAF, minor allele frequency; Ref, reference base; SIFT, sorting intolerant from tolerant; SNP, single nucleotide polymorphism; Var, variant base.

displaying multiple pilomatricomas (33, 36, 37). As MCM8 is also involved in the MMR pathway, in the same way, biallelic alterations of *MCM8* are also expected to be associated with pilomatricomas. This observation therefore corresponds to a novel phenotype associated with *MCM8* variant and illustrates the phenotypic variety of patients carrying mutations of this gene.

SGA or IUGR is a frequent manifestation found in some chromosomal breakage syndromes like Bloom syndrome or Fanconi anemia, as in our patient. Our observation, combined with previous reports, confirms that DNA damage is a driver for growth delay and may explain IUGR in chromosome instability syndromes (38). GH therapy is used in short children born SGA without catch-up growth. They correspond to a heterogeneous group. Currently available data do not indicate any increase in cancer risk during or after GH therapy (39). However, in some disorders such as in chromosomal breakage syndromes and DNA repair disorders, GH therapy is contraindicated because patients have an increased risk to develop cancer at a younger age. In these cases, GH may stimulate malignant cell growth (the SAGhE European cohort study) (39). Our patient, SGA, was treated during adolescence with GH without knowing that she had chromosomal instability. This may not be uncommon. Similar to recommendations for other chromosomal breakage syndromes such as Bloom syndrome (17, 38), our observation highlights the necessity to perform genetic analysis of *MCM8* before starting GH therapy in adolescents presenting with POI with small stature and normal karyotype in a familial or consanguineous context (17, 38).

The heterozygous mother developed secondary amenorrhea at the age of 29 years. In the mother, MMC induced an intermediate but significant increase of chromosomal breaks when compared with a control, and complex chromosomal rearrangements were observed (Fig. 3). In previously reported families with pathogenic *MCM8* or *MCM9* pathogenic variants, altered DNA repair ability was also observed in the heterozygous mothers, but they did not develop POI (6, 7, 28, 29). In this observation, the mother presented apparently transient hypothyroidism related to autoimmune thyroiditis and Behcet disease treated by colchicine. The presence of these environmental factors may explain the difference with the reported heterozygous carriers of *MCM8* pathogenic variants. Indeed, these factors, especially autoimmunity, might have played an additive role to alter ovarian function. Such heterozygous carriers of *MCM8* pathogenic variants should have fertility preservation to avoid precocious depletion of the follicular pool, particularly in the presence of other environmental factors.

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/105/6/dgaa155/5815316 by JEPU ProfCORIAT user on 04 May 2020

Mice deficient in *Mcm8* or *Mcm9* developed ovarian tumors or hepatocellular carcinoma (32, 40). This is expected as both proteins are involved in DNA repair and MMR. However, the link between *MCM8-9* variants and tumor/cancer is unclear in humans. The screening of a large Australian cohort of more than 100 patients with Lynch-like syndrome failed to identify clearly pathogenic variants of *MCM9* (41). Furthermore, a homozygous nonsense *MCM9* variant was found in 2 sisters with POI and hereditary colorectal cancer (31). However, the 2 sisters also harbored 2 compound heterozygous variants of *MUTYH*, a known gene causing colorectal cancer (31). Our patient had pilomatricomas. This is the first report of tumors associated with *MCM8/9* pathogenic variants in humans. Long-term monitoring of such patients should be discussed in a multidisciplinary team.

In conclusion, we report a novel phenotype associated with a homozygous mutation of *MCM8* combining POI, IUGR, postnatal short stature, and multiple pilomatricomas. This observation has wide implication in the management of patients with POI and SGA and/or small stature. Mutations of *MCM8* should be searched before starting GH therapy in such cases, in a familial or consanguineous context, and similarly to other chromosomal breakage syndromes. On the other hand, heterozygous carriers of pathogenic *MCM8* variant may develop POI with SA in the presence of additional exogenous factors. An appropriate management and eventual fertility preservation have to be discussed. A long follow-up of such patients may contribute to better estimate cancer risk in this population and to draw clinical guidelines.

Acknowledgments

Financial Support: This work was supported by grants from the Agence de Biomedecine (reference number PFS12-002).

Additional Information:

Correspondence: Prof Micheline Misrahi, Universités Paris Sud-Paris Saclay, Faculté de Médecine, Hôpital Bicêtre, 94275, Le Kremlin-Bicêtre, France. E-mail: micheline.misrahi@aphp.fr.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

REFERENCES

1. Huhtaniemi I, Hovatta O, La Marca A, et al. Advances in the molecular pathophysiology, genetics, and treatment of primary ovarian insufficiency. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;**29**(6):400-419.
2. Caburet S, Arboleda VA, Llano E, et al. Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N Engl J Med*. 2014;**370**(10):943-949.
3. Caburet S, Todeschini AL, Petrillo C, et al. A truncating MEIOB mutation responsible for familial primary ovarian insufficiency abolishes its interaction with its partner SPATA22 and their recruitment to DNA double-strand breaks. *EBioMedicine*. 2019;**42**:524-531.
4. de Vries L, Behar DM, Smirin-Yosef P, Lagovsky I, Tzur S, Basel-Vanagaite L. Exome sequencing reveals SYCE1 mutation associated with autosomal recessive primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;**99**(10):E2129-E2132.
5. Wang J, Zhang W, Jiang H, Wu BL; Primary Ovarian Insufficiency Collaboration. Mutations in HFM1 in recessive primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med*. 2014;**370**(10):972-974.
6. Wood-Trageser MA, Gurbuz F, Yatsenko SA, et al. MCM9 mutations are associated with ovarian failure, short stature, and chromosomal instability. *Am J Hum Genet*. 2014;**95**(6):754-762.
7. AlAsiri S, Basit S, Wood-Trageser MA, et al. Exome sequencing reveals MCM8 mutation underlies ovarian failure and chromosomal instability. *J Clin Invest*. 2015;**125**(1):258-262.
8. Qin Y, Guo T, Li G, et al. CSB-PGBD3 mutations cause premature ovarian failure. *PLoS Genet*. 2015;**11**(7):e1005419.
9. Carlosama C, Elzaiat M, Patiño LC, Mateus HE, Veitia RA, Laissue P. A homozygous donor splice-site mutation in the meiotic gene MSH4 causes primary ovarian insufficiency. *Hum Mol Genet*. 2017;**26**(16):3161-3166.
10. Fouquet B, Pawlikowska P, Caburet S, et al. A homozygous FANCM mutation underlies a familial case of non-syndromic primary ovarian insufficiency. *Elife* 2017;**6**. doi:10.7554/eLife.30490.
11. Guo T, Zhao S, Zhao S, et al. Mutations in MSH5 in primary ovarian insufficiency. *Hum Mol Genet*. 2017;**26**(8):1452-1457.
12. Smirin-Yosef P, Zuckerman-Levin N, Tzur S, et al. A biallelic mutation in the homologous recombination repair gene SPIDR is associated with human gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;**102**(2):681-688.
13. Al-Agha AE, Ahmed IA, Nuebel E, et al. Primary ovarian insufficiency and azoospermia in carriers of a homozygous PSMC3IP stop gain mutation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;**103**(2):555-563.
14. He WB, Tu CF, Liu Q, et al. DMC1 mutation that causes human non-obstructive azoospermia and premature ovarian insufficiency identified by whole-exome sequencing. *J Med Genet*. 2018;**55**(3):198-204.
15. Weinberg-Shukron A, Rachmiel M, Renbaum P, et al. Essential role of BRCA2 in ovarian development and function. *N Engl J Med*. 2018;**379**(11):1042-1049.
16. Zhou Y, Qin Y, Qin Y, et al. Wdr62 is involved in female meiotic initiation via activating JNK signaling and associated with POI in humans. *PLoS Genet*. 2018;**14**(8):e1007463.
17. Renes JS, Willemsen RH, Wagner A, Finken MJ, Hokken-Koelega AC. Bloom syndrome in short children born small for gestational age: a challenging diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;**98**(10):3932-3938.
18. Neyzi O, Furman A, Bundak R, Gunoz H, Darendeliler F, Bas F. Growth references for Turkish children aged 6 to 18 years. *Acta Paediatr*. 2006;**95**(12):1635-1641.
19. Heddar A, Dessen P, Flatters D, Misrahi M. Novel STAG3 mutations in a Caucasian family with primary ovarian insufficiency. *Mol Genet Genomics*. 2019;**294**(6):1527-1534. doi:10.1007/s00438-019-01594-4.
20. Seelow D, Schuelke M, Hildebrandt F, Nürnberg P. HomozygosityMapper–an interactive approach to homozygosity mapping. *Nucleic Acids Res*. 2009;**37**(Web Server issue):W593-W599.
21. Heddar A, Beckers D, Fouquet B, Roland D and Misrahi M. A novel phenotype combining primary ovarian insufficiency growth retardation and pilomatricomas with MCM8 mutation. *Dryad Dataset*. https://doi.org/10.5061/dryad.brv15dv5w.

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/105/6/dgaa155/5815316 by JEPU ProfCORIAT user on 04 May 2020

22. Maiorano D, Lutzmann M, Méchali M. MCM proteins and DNA replication. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;**18**(2):130-136.
23. Traver S, Coulombe P, Peiffer I, et al. MCM9 is required for mammalian DNA mismatch repair. *Mol Cell*. 2015;**59**(5):831-839.
24. Lee KY, Im JS, Shibata E, et al. MCM8-9 complex promotes resection of double-strand break ends by MRE11-RAD50-NBS1 complex. *Nat Commun*. 2015;**6**:7744.
25. Nishimura K, Ishiai M, Horikawa K, et al. Mcm8 and Mcm9 form a complex that functions in homologous recombination repair induced by DNA interstrand crosslinks. *Mol. Cell* 2012;**47**(4):511-522.
26. Nagy E, Maquat LE. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci*. 1998;**23**(6):198-199.
27. Rivas MA, Pirinen M, Conrad DF, et al.; GTEx Consortium; Geuvadis Consortium. Human genomics. Effect of predicted protein-truncating genetic variants on the human transcriptome. *Science*. 2015;**348**(6235):666-669.
28. Tenenbaum-Rakover Y, Weinberg-Shukron A, Renbaum P, et al. Minichromosome maintenance complex component 8 (MCM8) gene mutations result in primary gonadal failure. *J Med Genet*. 2015;**52**(6):391-399.
29. Bouali N, Francou B, Bouligand J, et al. New MCM8 mutation associated with premature ovarian insufficiency and chromosomal instability in a highly consanguineous Tunisian family. *Fertil Steril*. 2017;**108**(4):694-702.
30. Fauchereau F, Shalev S, Chervinsky E, et al. A non-sense MCM9 mutation in a familial case of primary ovarian insufficiency. *Clin Genet*. 2016;**89**(5):603-607.
31. Goldberg Y, Halpern N, Hubert A, et al. Mutated MCM9 is associated with predisposition to hereditary mixed polyposis and colorectal cancer in addition to primary ovarian failure. *Cancer Genet*. 2015;**208**(12):621-624.
32. Lutzmann M, Grey C, Traver S, et al. MCM8- and MCM9-deficient mice reveal gametogenesis defects and genome instability due to impaired homologous recombination. *Mol Cell*. 2012;**47**(4):523-534.
33. Richet C, Maza A, Dreyfus I, Bourrat E, Mazereeuw-Hautier J. Childhood pilomatricomas: Associated anomalies. *Pediatr Dermatol*. 2018;**35**(5):548-551.
34. Pujol RM, Casanova JM, Egido R, Pujol J, de Moragas JM. Multiple familial pilomatricomas: a cutaneous marker for Gardner syndrome? *Pediatr Dermatol*. 1995;**12**(4):331-335.
35. Handler MZ, Derrick KM, Lutz RE, Morrell DS, Davenport ML, Armstrong AW. Prevalence of pilomatricoma in Turner syndrome: findings from a multicenter study. *JAMA Dermatol*. 2013;**149**(5):559-564.
36. Jasperson KW, Samowitz WS, Burt RW. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome presenting as colonic adenomatous polyposis: clues from the skin. *Clin Genet*. 2011;**80**(4):394-397.
37. Chmara M, Wernstedt A, Wasag B, et al. Multiple pilomatricomas with somatic CTNNB1 mutations in children with constitutive mismatch repair deficiency. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;**52**(7):656-664.
38. García-de Teresa B, Hernández-Gómez M, Frías S. DNA damage as a driver for growth delay: chromosome instability syndromes with intrauterine growth retardation. *Biomed Res Int* 2017;**2017**:8193892.
39. Swerdlow AJ, Cooke R, Beckers D, et al. Cancer risks in patients treated with growth hormone in childhood: the SAGhE European Cohort Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;**102**(5):1661-1672.
40. Hartford SA, Luo Y, Southard TL, Min IM, Lis JT, Schimenti JC. Minichromosome maintenance helicase paralog MCM9 is dispensible for DNA replication but functions in germ-line stem cells and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;**108**(43):17702-17707.
41. Liu Q, Hesson LB, Nunez AC, et al. Pathogenic germline MCM9 variants are rare in Australian Lynch-like syndrome patients. *Cancer Genet*. 2016;**209**(11):497-500.

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/105/6/dgaa155/5815316 by JEPU ProfCORIAT user on 04 May 2020

Confirmation de l'implication de *STAG3*, le premier gène de méiose de l'IOP dans une famille Caucasienne non-consanguine

Article 3: Novel STAG3 mutations in a Caucasian family with primary ovarian insufficiency

Abdelkader Heddar, Philippe Dessen, Delphine Flatters, Micheline Misrahi
Mol Genet Genomics. 2019 Dec;294(6):1527-1534. doi: 10.1007/s00438-019-01594-4

3.3 NOVEL STAG3 MUTATIONS IN A CAUCASIAN FAMILY WITH PRIMARY OVARIAN INSUFFICIENCY.

Mol Genet Genomics. 2019 Dec;294(6):1527-1534. doi: 10.1007/s00438-019-01594-4

STAG3 fait partie du complexe cohésine indispensable au bon alignement des chromosomes (Figure 12). Ce complexe cohésine est indispensable à la fois au niveau des cellules somatiques mais également des cellules gonadiques. Il est composé également d'autres protéines à savoir SMC1α/SMC1β et SMC3 en plus de *RAD21/REC8* ou *RAD21L*(Hopkins *et al.*, 2014) (Figure 12). Ce complexe forme un anneau autour des chromatides sœurs pour les maintenir ensemble pendant la mitose et la méiose (Figure 12). Alors que SMC1α et RAD21 sont présentes à la fois dans les cellules méiotiques et mitotiques, SMC1β, REC8 et RAD21L ne sont présentes que dans les cellules méiotiques. De la même façon, STAG1/2 sont présentes dans les cellules somatiques, tandis que STAG3 n'est présente que dans les cellules germinales. En effet, les études d'expression ont révélé que STAG3 est exprimée exclusivement au niveau des cellules germinales à la fois dans l'ovaire et le testicule. *STAG3* est l'un des premiers gènes notamment de méiose, impliqué dans les IOP isolées. En effet, une mutation tronquante homozygote de *STAG3* qui ségrége avec le phénotype d'IOP a été identifiée dans une grande famille consanguine d'origine Palestinienne dans laquelle 4 sœurs présentant une IOP

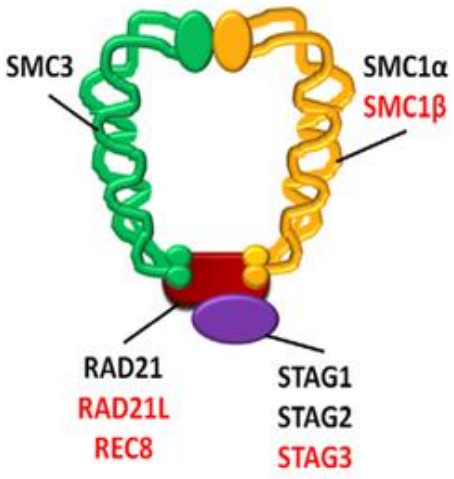


Figure 12 : le complexe cohesine. En rouge les proteines spécifique de la meiose. Adaptée de Hopkins *et al.,* 2014

(Caburet *et al.*, 2014). Une patiente de cette famille avait développé une tumeur ovarienne (Caburet *et al.*, 2014). Le modèle murin correspondant est également stérile à la fois chez la souris mâle et femelle (Caburet *et al.*, 2014; Hopkins *et al.*, 2014). Avant la publication de notre article, et depuis cette première description, uniquement trois autres mutations bi-alléliques, toutes tronquantes, ont été décrites dans des familles consanguines avec IOP (Le Quesne Stabej *et al.*, 2016; Colombo *et al.*, 2017; He *et al.*, 2018a). Une autre observation rapporte une seule patiente avec IOP et deux variants tronquants présumés à l'état hétérozygote composite, en l'absence de prélèvement des parents (França *et al.*, 2019).

Dans cet article, Nous avons rapporté et discuté l'impact fonctionnel de la première mutation faux-sens non tronquante de *STAG3* dans une famille non-consanguine (Heddar *et al.*, 2019a). Il s'agit d'une famille d'origine Française dans laquelle deux sœurs ont présenté une IOP caractérisée par une aménorrhée primaire avec absence de développement pubertaire. Le diagnostic a été fait respectivement à l' âge de 13 et 17 ans. Leur mère ne présentait pas de trouble du cycle avant 40 ans et a été ménopausée à 51 ans. Les explorations de première intention avec caryotype et recherche de prémutation du gène *FMR1* sont revenues normales et le bilan auto-immun est négatif. L'étude d'exome comparatif entre celui des deux sœurs et de leur mère nous a permis de mettre en évidence deux variants du gène *STAG3* à l'état hétérozygote composite. Le premier variant pathogène, d'origine paternelle, est une délétion d'un seul nucléotide dans l'exon 28 : NM_001282716.1 : c.3052delC : p.Arg960Aspfs*14 situé dans l'extrémité C-terminale. Le transcrit résultant serait soit dégradé par le mécanisme NMD ou vraisemblablement à l'origine d'une protéine tronquée. Le deuxième variant probablement pathogène est une substitution faux-sens

dans l'exon 7 : NM_001282716.1 : c.659T>G : p.Leu220Arg à l'origine du remplacement d'une leucine, un acide aminé non polaire, par une arginine, un acide aminé polaire, en position 220. Cet acide aminé est situé dans le domaine STAG de la protéine hautement conservé chez les mammifères et le poisson zèbre. Cette variation est prédite comme étant délétère par tous les logiciels de prédiction bio-informatiques. Les deux variants sont décrits à l'état hétérozygote uniquement dans la base de données GnomAD exome avec une fréquence très faible (respectivement 3.23e-05 et 4.06e-06). Le phénotype des deux patientes est très concordant avec celui rapporté dans la littérature mais également avec le modèle murin. En effet, toutes les patientes porteuses de mutation bi-allélique de STAG3 présentaient une aménorrhée primaire avec absence de développement pubertaire (Caburet *et al.*, 2014; Le Quesne Stabej *et al.*, 2016; Colombo *et al.*, 2017; He *et al.*, 2018a). L'examen échographique, quand il est effectué, révèle toujours un utérus infantile avec des ovaires atrophiques, voire invisibles. Chez la souris, l'étude histologique a révélé que les souris stag3-/- présentaient une absence très précoce de follicule ovarien, indiquant une dysgénésie ovarienne sévère et très précoce (Caburet *et al.*, 2014).

Dans cette observation, nous avons rapporté la première implication de ce gène dans une forme non-consanguine d'IOP et confirmons ainsi l'implication de ce gène dans différentes ethnies.

Après la publication de notre article, d'autres observations ont rapporté d'autres variants exclusivement bi-alléliques de *STAG3* à l'origine d'une IOP (Xiao *et al.*, 2019; Jaillard *et al.*, 2020; Demain *et al.*, 2021; Eskenazi *et al.*, 2021; Mellone *et al.*, 2021; Akbari *et al.*, 2022; Gómez-Rojas *et al.*, 2022; Tucker *et al.*, 2022a). De plus, dans notre grande cohorte publiée récemment (Heddar *et al.*, 2022b) (cf. plus loin), nous

avons identifié 5 variants supplémentaires à savoir un délétion hétérozygote emportant les exons 7-15 de *STAG3*, deux variants tronquants, un variant faux sens et une délétion en phase homozygote chez 5 patientes dont deux sœurs. Ainsi, on compte à ce jour au total 25 variants de *STAG3* rapportés (10 variants tronquants, 7 variants faux-sens, 3 délétions en phase, 2 variants d'épissage, 2 délétions intra géniques emportant totalement ou partiellement *STAG3)* et décrits chez 27 patientes ayant des origines ethniques différentes. Comparé aux autres gènes impliqués dans l'IOP, qui sont souvent rapportés dans des familles ou des patientes isolées, on peut considérer aujourd'hui *STAG3* comme l'un des gènes les plus souvent retrouvé muté dans l'IOP. Il n'existe pas de corrélation entre la sévérité du variant et le phénotype des patientes. En effet, chez toutes les patientes rapportées, et ce quelque soit le génotype et le type du variant de *STAG3* (troncature homozygote, délétion en phase homozygote, variant faux-sens homozygote), le phénotype est identique à savoir une aménorrhée primaire avec des ovaires atrophiés voire invisibles et une absence de développement pubertaire. Ce phénotype est toujours concordant avec l'observation initiale (Caburet *et al.*, 2014) et celle de nos deux patientes (Heddar *et al.*, 2019a) mais également avec le modèle murin (Caburet *et al.*, 2014).

D'une façon intéressante des études récentes rapportent l'implication de *STAG3* dans l'infertilité masculine (Riera-Escamilla *et al.*, 2019; van der Bijl *et al.*, 2019; Jaillard *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021; Akbari *et al.*, 2022). Il existe en effet des familles dans lesquelles ont été décrites à la fois une IOP et une azoospermie non obstructive (Jaillard *et al.*, 2020; Akbari *et al.*, 2022). Le conseil génétique dans l'IOP doit donc inclure la recherche d'antécédent d'infertilité masculine mais également doit être pris en compte dans l'enquête familiale une fois la mutation décrite.

L'expression exclusive de STAG3 dans les cellules germinales peut expliquer l'absence de manifestation somatique chez les patientes avec des mutations de ce gène contrairement aux altérations des autres gènes codant d'autres sous-unités du complexe cohésine. Par exemple, les mutations hétérozygotes du gène *NIPBL* sont responsables du syndrome de Cornelia de Lange, une cohésinopathie, caractérisée par une déficience intellectuelle, une dysmorphie caractéristique et une atteinte multi organe. Les mutations de *STAG*2 impliquées dans des formes syndromiques de déficience intellectuelle ou ont une valeur pronostique dans certains types de tumeurs. En effet, il a été démontré que les mutations somatiques du gène *STAG2* augmentent le taux d'aneuploïdie des cellules tumorales (Solomon *et al.*, 2011). Cependant, parmi les 27 patientes présentant une IOP et deux variants bi-alléliques de *STAG3*, une seule patiente avait développé une tumeur ovarienne (Caburet *et al.*, 2014). Le lien de causalité entre l'altération moléculaire de *STAG3* et le développement de la tumeur ovarienne chez cette patiente n'est pas clairement établi. L'appréciation du risque de malignité chez les patientes avec IOP et mutation bi-allélique de *STAG3* est difficile à évaluer à ce jour. Un suivi à long terme de ces patientes permettra de mieux apprécier ce risque tumoral. Cependant, la surveillance des tumeurs de l'ovaire constitue un défi sur le plan clinique et radiologique. Il reste néanmoins prudent de discuter une surveillance de ces patientes par imagerie non invasive ou bien de réaliser une ovariectomie prophylactique. En effet, les ovaires de ces patientes sont dépourvus de follicule et donc non fonctionnels.

Molecular Genetics and Genomics (2019) 294:1527–1534
https://doi.org/10.1007/s00438-019-01594-4

ORIGINAL ARTICLE

Novel *STAG3* mutations in a Caucasian family with primary ovarian insufficiency

Abdelkader Heddar[1,2] · Philippe Dessen[3] · Delphine Flatters[4] · Micheline Misrahi[1,2]

Received: 13 February 2019 / Accepted: 6 July 2019 / Published online: 30 July 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Primary ovarian insufficiency (POI) affects ~ 1–3, 7% of women under forty and is a public health problem. Most causes are unknown, but an increasing number of genetic causes have been identified recently. The identification of such causes is essential for genetic and therapeutic counseling in patients and their families. We performed whole exome sequencing in two Caucasian sisters displaying non syndromic POI and their unaffected mother. We identified two novel pathogenic variants in *STAG3* encoding a meiosis-specific subunit of the cohesin ring, which ensures correct sister chromatid cohesion: a c.3052delC truncating mutation in exon 28 yielding p.Arg1018Aspfs*14, and a c.659T > G substitution in exon seven yielding p.Leu220Arg. Leu220, highly conserved throughout species, belongs to the STAG domain conserved with other mitotic subunits of the cohesion complex STAG1 and 2. In silico analysis reveals that this substitution markedly impacts the structure of this domain. The truncation removes the last 206 C-terminal residues, not conserved in STAG1 and 2, supporting an important specific role in STAG3, especially meiosis. This is the first occurrence of *STAG3* mutations in a Caucasian family. Very little is known about the function of STAG proteins domains. The "knock out-like" phenotype described here supports the crucial role of a single residue in the STAG domain and of the C-terminal region in STAG3 function. In conclusion, this observation shows the necessity to perform the genetic study of POI worldwide including *STAG3*. This could lead to appropriate genetic counseling and long term follow-up since these patients may develop ovarian tumors.

Keywords Primary ovarian insufficiency · STAG3 · Meiosis · STAG domain · Whole exome sequencing · Mutation · Genetics

Introduction

Primary ovarian insufficiency (POI) is defined by amenorrhea or oligomenorrhea over 4 months with elevated follicle stimulating hormone (FSH) ≥ 25 UI/l in women under 40 years (Huhtaniemi et al. 2018). A very recent meta-analysis revealed that the prevalence of POI is 3.7% worldwide (Golezar et al. 2019). POI is associated with a significant morbidity due in part to steroid hormones deficiency: an increased risk of osteoporosis and fractures, overall cardiovascular diseases, type 2 diabetes and total mortality has been described. A premature decline in cognitive function and mood disorders have also been described (Huhtaniemi et al. 2018; Golezar et al. 2019). This makes this condition a public health problem (Golezar et al. 2019). POI is often diagnosed too late, generating severe irreversible consequences for fertility and well-being of the affected women. Other extra-ovarian morbidities are direct consequences of specific causes of syndromic POI (Huhtaniemi et al. 2018).

Communicated by Stefan Hohmann.

Electronic supplementary material The online version of this article (https://doi.org/10.1007/s00438-019-01594-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Micheline Misrahi
micheline.misrahi@aphp.fr

1 Faculté de Médecine, Universités Paris Sud-Paris Saclay, Hôpital Bicêtre, 94275 Paris, France

2 Unité de Génétique Moléculaire des Maladies Métaboliques et de la Reproduction, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Hôpital Bicêtre AP-HP, Le Kremlin-Bicêtre, 94275 Paris, France

3 INSERM U1170, Gustave Roussy Institute, Universités Paris Sud, Paris Saclay, 39 rue Camille Desmoulins, Villejuif, 94800 Paris, France

4 INSERM UMR973, Molécules Thérapeutiques in silico, Université Paris Diderot-Paris VII, Sorbonne Paris Cité, 75013 Paris, France

About one-third of POI is considered to be of genetic origin and there is a high genetic heterogeneity. Most causes are unknown but recently an increased number of genetic causes have been identified especially by whole exome sequencing (WES). The genetic diagnosis of POI is critical not only to establish the cause of patients' infertility and to perform genetic and therapeutic counseling within the family but also to search for co-morbidities associated with specific gene defects. Recently, genes involved in DNA repair and meiosis have been shown to cause POI (Smirin-Yosef et al. 2017; Huhtaniemi et al. 2018; Zhou et al. 2018; Zhang et al. 2018). It has been shown that tumor or cancer predispositions are associated with mutations of such genes (Caburet et al. 2014; Wood-Trageser et al. 2014; AlAsiri et al. 2015; Fouquet et al. 2017; Weinberg-Shukron et al. 2018).

Up to now, more than 60 genes have been reported to cause POI (Huhtaniemi et al. 2018). However, they have been found at most in one or two families, and in specific populations. They require replication in independent studies (Smirin-Yosef et al. 2017; Huhtaniemi et al. 2018; Zhou et al. 2018; Zhang et al. 2018). As mutations of meiosis/DNA repair genes may also be implicated in tumor/cancer, it is, therefore, very important to confirm their involvement in the etiology of POI and to know the prerequisite that should lead to their study.

Patients with POI may have primary amenorrhea (PA) in combination with delayed puberty, or secondary amenorrhea (SA) occurring after regular menarche for a variable period of time. Although many iatrogenic (chemotherapy, surgery, or irradiation), autoimmune, or viral factors can cause POI, more than 70% of cases remain idiopathic (Huhtaniemi et al. 2018).

Mutations of *STAG3* (*stromal antigen 3*), which encodes a meiosis-specific subunit of the cohesin complex involved in sister chromatids pairing, were identified in rare Middle-eastern and Asian POI (Caburet et al. 2014; Le Quesne Stabej et al. 2016; Colombo et al. 2017; He et al. 2018). Here, we report the first Caucasian family with two sisters presenting a severe phenotype of non-syndromic POI including PA, lack of puberty and streak ovaries, with novel biallelic mutations in *STAG3*. This observation further supports the crucial role of meiotic genes in ovarian pathophysiology. *STAG3* has to be studied in all unexplained POI with PA worldwide for genetic diagnosis and appropriate monitoring in the long term since such patients could also develop ovarian tumors, as shown by a previous POI case and by the rodent knock out model. The novel mutations identified highlight for the first time the crucial role of a residue within the STAG domain and of the C-terminus in STAG3 function.

Patients and methods

Medical history and clinical data

Informed consent was obtained from the patients and all institutions involved in the study. The pedigree of this Caucasian family is presented in Fig. 1. The proposita was referred at 13 years for PA and lack of pubertal development. She measured 1 m 46 (− 1.5 DS) and weighed 35 kg (− 2 DS). Her body mass index (BMI) was 16.4 kg/m^2. Physical examination revealed an absence of breast development and no other clinical sign. Hormonal assays confirmed POI with high FSH (86 UI/l) and luteinizing hormone (LH) (27.5 UI/l) and low estradiol (E2) (< 3 pg/ml) plasma levels. Ovarian antibodies were undetectable, and karyotype was 46, XX. *FMR1* premutation screening was negative. Pelvic ultrasonography (US) showed a small uterus with streak ovaries. Hormone replacement therapy was started. The last clinical examination at 29 years old in another center confirmed POI without any other clinical sign. She measured 1 m 68 and weighted 49 kg (BMI = 17.6 kg/m^2).

Her younger sister was seen at 17 years of age in another center for lack of pubertal development and PA. Hormonal assays confirmed the diagnosis of POI. Hormone replacement therapy was started. The last clinical examination at the age 25 years does not reveal any particular complication. She measured 1.66 cm and weighted 55 kg (BMI = 19.9 kg/m^2). There was no familial history of POI, autoimmune, or cancer diseases especially ovarian tumors. The mother had menopause at the age of 51 years.

Exome and sanger sequencing

Exome sequencing was performed on genomic DNA extracted from the peripheral blood of patients I.2 (mother), II.1 (proposita), and II.2 (sister) (Fig. 1b). Library preparation, exome capture, sequencing, and data processing were performed by IntegraGen SA (Evry, France) according to their in-house procedures. Data analysis was performed as described in (Fouquet et al. 2017). Briefly, exon enrichment was performed on 600 ng of DNA, using the Agilent SureSelect Human All Exons kit version CRE (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Exon-enriched libraries were subjected to a 75 bp paired-end sequencing on an HiSeq2500, according to the manufacturer's protocol. Reads alignment to the human reference genome (GRCh38) and variant calling were performed using the Illumina pipeline (CASAVA 1.8.2). Variant annotation was performed using variant effect predictor tools. The variants were filtered using SIRIUS, an IntegraGen in-house pipeline platform.

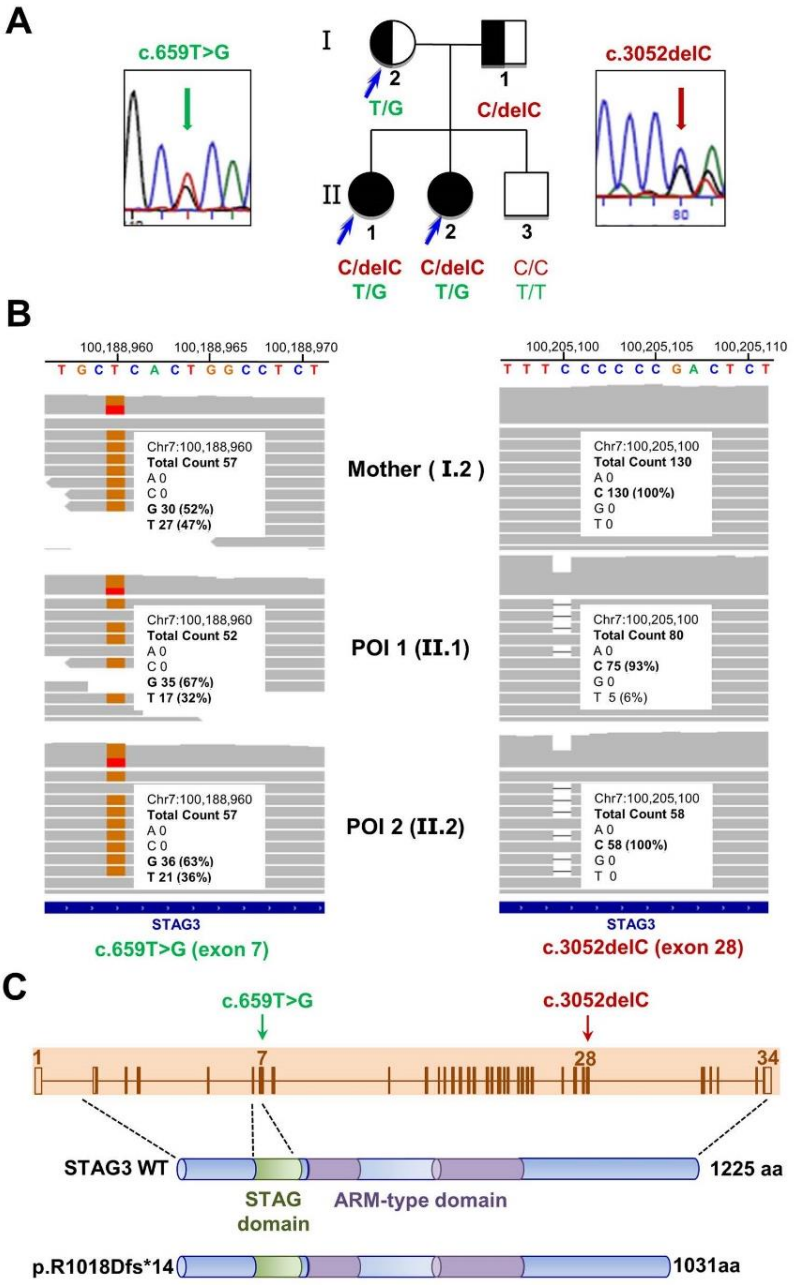


Fig. 1 Pedigree of the family and molecular analysis. **a** Pedigree of the family with two POI sisters and electropherograms of sanger sequencing. *WES* whole exome sequencing. **b** Visualization of exome data in IGV (integrative genomics viewer). The coverage for each variant is reported. Both variants have coverage of at least 50× for the three individuals. **c** Structure of the STAG3 gene and protein, and position of the causal variants. *STAG3* stromal antigen 3. STAG domain is represented in green and the armadillo (ARM)-type domain, which is predicted to interact with a nucleic acid or another protein, in purple. The diagrams of STAG proteins are adapted from (Pezzi et al. 2000) and from PFAM (http://pfam.xfam.org/family/PF08514). *WT* wild type

Each exome was processed using the following bioinformatic filters: (i) variants with a read coverage of less than 5× and a Qscore of below 20 were filtered out; (ii) we filtered the variations against the 1000 Genomes Project data set (May 2011, 20101123 release, http://www.1000genomes.org), the ESP cohort data set (ESP6500, http://evs.gs.washington.edu/EVS/) and GnomAD (exome and genome; http://gnomad.broadinstitute.org/) using an allelic

frequency filter of 0.01. In the absence of consanguinity in this Caucasian family, we tested the hypothesis of compound heterozygous mutations transmitted in a recessive model. Two pathogenic heterozygous variants in the same gene, transmitted by both parents, would be present in the POI patients. For missense variants, we used the following in silico prediction tools: SIFT, Polyphen, CADD and FATHMM-MKL throw Varsome website (https://varsome.com/) and M-CAP (http://bejerano.stanford.edu/mcap/). The latter is a variant pathogenicity classifier of rare missense variants that combines previous pathogenicity scores with higher sensitivity (Jagadeesh et al. 2016).

Relevant pathogenic variants detected were confirmed by direct genomic sanger sequencing of *STAG3* using the followings primers pairs:

5′ – GACTACCCTCTCATAGCTCCAG – 3′ and
5′ – GGAAGAAGCAGGGAACACTC – 3′

5′ – CCAACCAAGGGAAGGCATC – 3′ and
5′ – TCTCTATCCACCCACCAACT – 3′

In silico protein 3D structure analysis

For structural analysis of the missense variant, we used MODELLER (v9.19) software to build a 3D model of STAG3 wild-type and mutant as described (Sali and Blundell 1993; Webb and Sali 2014). This software is based on the satisfaction of spatial restraints of atoms and the comparison between a given protein sequence (as target) with one or more related proteins with known structures (templates). It requires first alignments of target to templates sequences. In our case, since the 3D model of STAG3 is not known, we first performed the sequence alignment of STAG3 and STAG2 using EMBOSS program based on Smith and Waterman algorithm (Rice et al. 2000). STAG2 has two known 3D structures (PDB: 4PJU and 4PK7). Regions 154–1048 in STAG2 and 112–998 in STAG3 shared 56.8% identity (75.2% similarity). Then, we generated the STAG3 3D model for the wild-type and the mutant proteins using the STAG2 PDB structure 4PJU as a template (Hara et al. 2014). The ten best models were selected according to the DOPE score (Shen and Sali 2006). Results for the wild-type and the mutant STAG3 proteins are shown in Fig. 3.

Results

Exome sequencing allowed to detect two exonic variants shared between patient II.1 and patient II.2 (Supplementary Tables 1 and 2). The first missense variant, also found in the mother, is located in exon seven of *STAG3* (NM_001282716.1: c.659T > G; p.Leu220Arg) (Fig. 1b). This residue is located in the conserved domain among all stromalin antigen (STAG) proteins (STAG1, 2 and 3) (Figs. 1c, 3) (Pezzi et al. 2000, p. 3). This residue is remarkably conserved in all species throughout the evolution in all STAG proteins (Fig. 3). The change is predicted pathogenic by different predicting softwares (Table 3 in Supplementary data). The second pathogenic variant is a 1 bp-deletion in exon 28 of *STAG3* (c.3052delC; p.Arg1018AspfsTer14) yielding a truncated protein (Fig. 1c) devoid of the last 206 C-terminal residues.

The missense mutation was reported in dbSNP as rs1289429589 with minor allele frequency (MAF) of 3.23e-05 in the GnomAD genome database, which includes 15.496 whole genome sequences, and is absent from the 123,136 exome sequences of this database. The truncating mutation has a MAF of 4.06e-06 in the Exome GnomAD database and is absent from all other human variants databases.

Sanger sequencing confirmed the presence of the missense mutation in both patients and their mother (Fig. 1a). The truncated mutation was transmitted from the father. The brother inherited the two reference alleles (Fig. 1a).

In silico analysis revealed that STAG3 adopts a conformation very close to that of the dragon-shaped crystal structure of STAG2 (Hara et al. 2014) (Fig. 2A). Leu 220 localized on helix nine at the N-terminal region is mainly involved in hydrophobic interactions. The ten best models built with MODELLER are superimposed in Fig. 2 (B and C). For the wild-type STAG3 models, the positions of the Leu 220 side chain are conserved in the ten models and this side chain is in close contact with Leu 216 and Leu 242. When Leu 220 is substituted by an Arginine, disruption of interaction with other hydrophobic residues in the vicinity is observed. Indeed, according to the ten models, either Arg 220 side chain is excluded from the helix loop and the two Leu 216 and 242 stay nearby (Fig. 2C-a) or the side chain points to the two leucines that deviate (Fig. 2C-b).

Discussion

STAG3 encodes the meiosis-specific subunit of the cohesin complex that also contain SMC1α/SMC1β and SMC3 in addition to RAD21/REC8 or RAD21L (Nishiyama 2018). The multiprotein cohesin complex forms a ring around sister chromatids to hold them together during mitosis and meiosis. Whereas SMC1α and RAD21 are ubiquitous, SMC1β, REC8, and RAD21L are present only in meiotic cells (Ward et al. 2016). STAG1/2 are present in mitotic cells (Carramolino et al. 1997) whereas STAG3 is present only in ovaries and testes (Pezzi et al. 2000; Caburet et al. 2014). It is worth noting that the impact of STAG proteins mutations is different in meiotic and mitotic cells. Indeed, while mono-allelic inactivation of *STAG3* appears to be tolerated

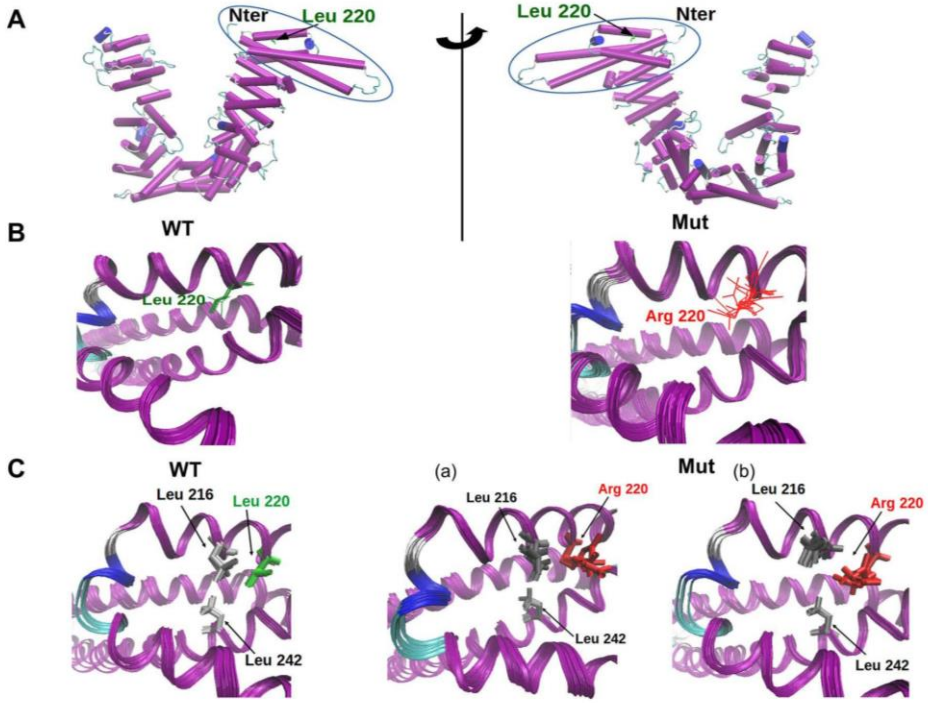


Fig. 2 Models of wild-type and mutant STAG3 proteins. **A** Cartoon diagram of the wild-type (WT) STAG3 model on the left and the same view at 180° on the right. The N-terminal region is circled in blue. Leu 220 is labelled and represented in green sticks. **B–C** Zoomed-in view of the N-terminal region of the WT STAG3 model (left) and the mutant (Mut) STAG3 model (right). In **B**, the ten best models for WT (left) and Mut (right) are superimposed. Leu 220 and Arg 220 are represented in sticks, respectively, in green for WT and in red for Mut. In **C** hydrophobic residues Leu 216 and Leu 242 are shown in sticks and are in close contact with Leu 220 in WT models. These contacts are disrupted in the presence of Arg 220 whose side chain can adopt two distinct conformations: **a** directed to the other side of the two leucines that remain close or **b** directed to the two leucines that deviate (in Mut models)

by meiotic cells, heterozygous loss of function mutations of STAG1/2 have been linked to cohesinopathies characterized by syndromic developmental delay (Mullegama et al. 2017; Lehalle et al. 2017).

Until now, only two consanguineous Asian and two Middle-eastern families (Caburet et al. 2014; Le Quesne Stabej et al. 2016; Colombo et al. 2017; He et al. 2018) with *STAG3* defects have been reported. All these patients display isolated POI with PA, lack of pubertal development, infantile uterus and streak gonads as in our patient. This phenotype is in line with that observed in the mouse model. Histological analysis revealed that *stag3-/-* mice lack ovarian follicles (Caburet et al. 2014). Our observation of the first Caucasian family supports the study of *STAG3* in all unexplained POI with PA worldwide for genetic diagnosis and counselling. *Stag3-/-* mouse females developed ovarian tumors (Caburet et al. 2014; Fukuda et al. 2014; Hopkins et al. 2014). Caburet et al. reported the presence of an ovarian tumor in relation with this biallelic inactivation of *STAG3* in a Palestinian family (Caburet et al. 2014). A regular ovarian monitoring by the US should be recommended for these patients.

All previous mutations of *STAG3* were large homozygous truncating mutations. Therefore, no information on the structure–function correlation of STAG3 could be established. Here, using WES, we identified compound heterozygous mutations in *STAG3*. The first mutation resulted in the replacement of a hydrophobic leucine (L), by a basic arginine (R), at position 220 (L220R). This residue is highly conserved in STAG3 during the evolution and between STAG1, 2. This conservation, together with the "knock out-like" phenotype observed in our patients, supports the functional importance of this residue in all meiotic STAG3 and also mitotic STAG proteins.

The second pathogenic variant was a 1 bp deletion p.Arg1018Aspfs*14 resulting in a premature stop codon with a deduced truncated protein devoid of the last 206

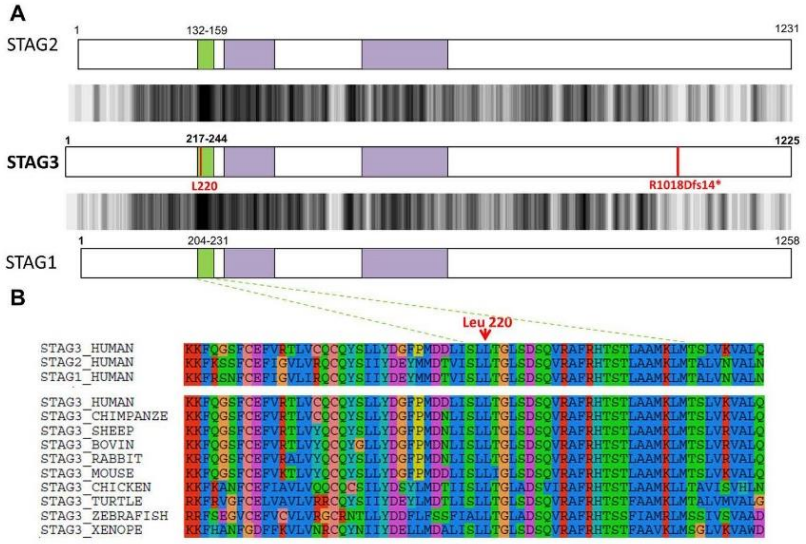


Fig. 3 Comparison between STAG3 and STAG½. **a** Comparison between STAG3 and STAG1 and 2, respectively. STAG3 is shown in the middle, STAG2 on top and STAG1 below. The two mutations are indicated by a red line. Between STAG3 and STAG 1 and 2, respectively, the identity percentages of the sliding window of 11 AA are represented between white (0%) and black (100%). *STAG* stromal antigene. STAG domain is represented in green and armadillo (ARM)-type domain, which is predicted to interact with a nucleic acid or another protein, in purple. The diagrams of STAG are adapted from (Pezzi et al. 2000) and from PFAM (http://pfam.xfam.org/family/PF08514). **b** Alignment of the three STAG (1, 2, 3) (on top) and of STAG3 proteins in different species (below) focused in the STAG domain using *SeaView* software (Gouy et al. 2010). The position of the amino acid (Leu 220) mutated in our patients is showed by an arrow

C-terminal residues (Fig. 1c). This region of STAG3 is not conserved with STAG 1 and 2 (Fig. 3). This supports an important specific functional role of this region in STAG3, especially meiosis.

Recently, two truncating mutations of *STAG3* were reported in a Brazilian POI (França et al. 2018). However, the authors were unable to confirm the compound heterozygous status of these variants in the absence of parent's DNA. Therefore, they could not demonstrate the implication of *STAG3* in the pathogenesis of the POI.

All *Stag3-/-* male mice described to date are infertile (Caburet et al. 2014; Fukuda et al. 2014; Llano et al. 2014). Very recently the first mutation of *STAG3* was described in a man with azoospermia (Riera-Escamilla et al. 2019). This observation is consistent with the mouse model and highlights the role of *STAG3* in meiosis in both sexes.

In conclusion, we report the first implication of *STAG3* in a Caucasian family with POI. This observation has wide impact in the genetic counseling and management of patients with POI; (i) Screening of this gene and all meiosis/DNA repair genes involved in POI should be performed in all unexplained POI worldwide with PA. (ii) Prolonged monitoring of patients with *STAG3* mutations should be performed considering the risk of ovarian tumors. Furthermore, the two novel mutations of *STAG3* identified here support the critical role of Leu220 and of the C-terminal part of STAG3 in cohesion function. Altogether, our work supports the crucial role of the cohesin complex in ovarian physiology and female reproduction worldwide. Larger studies and long term follow-up of POI patients harboring biallelic mutations of STAG3 will allow us to better evaluate the risk of tumors in these patients.

Acknowledgement We thank Prof. Reiner Veitia and Dr Sandrine Caburet (Jacques Monod Institute, Paris) for their support and helpful discussions.

Funding This work was supported by the Universities Paris South-Paris Saclay and Paris Diderot and by The French National Biomedical Agency (ABM).

Compliance with ethical standard

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or

national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

AlAsiri S, Basit S, Wood-Trageser MA, Yatsenko SA, Jeffries EP, Surti U, Ketterer DM, Afzal S, Ramzan K, Faiyaz-Ul Haque M, Jiang H, Trakselis MA, Rajkovic A (2015) Exome sequencing reveals MCM8 mutation underlies ovarian failure and chromosomal instability. J Clin Invest 125:258–262

Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, Harrison W, Vaiman D, Ben-Neriah Z, García-Tuñón I, Fellous M, Pendás AM, Veitia RA, Vilain E (2014) Mutant cohesin in premature ovarian failure. N Engl J Med 370:943–949

Carramolino L, Lee BC, Zaballos A, Peled A, Barthelemy I, Shav-Tal Y, Prieto I, Carmi P, Gothelf Y, González de Buitrago G, Aracil M, Márquez G, Barbero JL, Zipori D (1997) SA-1, a nuclear protein encoded by one member of a novel gene family: molecular cloning and detection in hemopoietic organs. Gene 195:151–159

Colombo R, Pontoglio A, Bini M (2017) A STAG3 missense mutation in two sisters with primary ovarian insufficiency. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 216:269–271

Fouquet B, Pawlikowska P, Caburet S, Guigon C, Mäkinen M, Tanner L, Hietala M, Urbanska K, Bellutti L, Legois B, Bessieres B, Gougeon A, Benachi A, Livera G, Rosselli F, Veitia RA, Misrahi M (2017) A homozygous FANCM mutation underlies a familial case of non-syndromic primary ovarian insufficiency. Elife. https://doi.org/10.7554/elife.30490

França MM, Nishi MY, Funari MFA, Lerario AM, Baracat EC, Hayashida SAY, Maciel GAR, Jorge AAL, Mendonca BB (2018) Two rare loss-of-function variants in the STAG3 gene leading to primary ovarian insufficiency. Eur J Med Genet. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.07.008

Fukuda T, Fukuda N, Agostinho A, Hernández-Hernández A, Kouznetsova A, Höög C (2014) STAG3-mediated stabilization of REC8 cohesin complexes promotes chromosome synapsis during meiosis. EMBO J 33:1243–1255

Golezar S, Ramezani Tehrani F, Khazaei S, Ebadi A, Keshavarz Z (2019) The global prevalence of primary ovarian insufficiency and early menopause: a meta-analysis. Climacteric 22:403–411

Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol Biol Evol 27:221–224

Hara K, Zheng G, Qu Q, Liu H, Ouyang Z, Chen Z, Tomchick DR, Yu H (2014) Structure of cohesin subcomplex pinpoints direct shugoshin-Wapl antagonism in centromeric cohesion. Nat Struct Mol Biol 21:864–870

He W-B, Banerjee S, Meng L-L, Du J, Gong F, Huang H, Zhang X-X, Wang Y-Y, Lu G-X, Lin G, Tan Y-Q (2018) Whole-exome sequencing identifies a homozygous donor splice-site mutation in STAG3 that causes primary ovarian insufficiency. Clin Genet 93:340–344

Hopkins J, Hwang G, Jacob J, Sapp N, Bedigian R, Oka K, Overbeek P, Murray S, Jordan PW (2014) Meiosis-specific cohesin component, STAG3 is essential for maintaining centromere chromatid cohesion, and required for DNA repair and synapsis between homologous chromosomes. PLoS Genet 10:e1004413. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004413

Huhtaniemi I, Hovatta O, La Marca A, Livera G, Monniaux D, Persani L, Heddar A, Jarzabek K, Laisk-Podar T, Salumets A, Tapanainen JS, Veitia RA, Visser JA, Wieacker P, Wolczynski S, Misrahi M (2018) Advances in the molecular pathophysiology, genetics, and treatment of primary ovarian insufficiency. Trends Endocrinol Metab 29:400–419

Jagadeesh KA, Wenger AM, Berger MJ, Guturu H, Stenson PD, Cooper DN, Bernstein JA, Bejerano G (2016) M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. Nat Genet 48:1581–1586

Le Quesne Stabej P, Williams HJ, James C, Tekman M, Stanescu HC, Kleta R, Ocaka L, Lescai F, Storr HL, Bitner-Glindzicz M, Bacchelli C, Conway GS (2016) STAG3 truncating variant as the cause of primary ovarian insufficiency. Eur J Hum Genet 24:135–138

Lehalle D, Mosca-Boidron A-L, Begtrup A, Boute-Benejean O, Charles P, Cho MT, Clarkson A, Devinsky O, Duffourd Y, Duplomb-Jego L, Gérard B, Jacquette A, Kuentz P, Masurel-Paulet A, McDougall C, Moutton S, Olivié H, Park S-M, Rauch A, Revencu N, Rivière J-B, Rubin K, Simonic I, Shears DJ, Smol T, Taylor Tavares AL, Terhal P, Thevenon J, Van Gassen K, Vincent-Delorme C, Willemsen MH, Wilson GN, Zackai E, Zweier C, Callier P, Thauvin-Robinet C, Faivre L (2017) STAG1 mutations cause a novel cohesinopathy characterised by unspecific syndromic intellectual disability. J Med Genet 54:479–488

Llano E, Gomez-H L, García-Tuñón I, Sánchez-Martín M, Caburet S, Barbero JL, Schimenti JC, Veitia RA, Pendas AM (2014) STAG3 is a strong candidate gene for male infertility. Hum Mol Genet 23:3421–3431

Mullegama SV, Klein SD, Mulatinho MV, Senaratne TN, Singh K, Clinical Genomics Center UCLA, Nguyen DC, Gallant NM, Strom SP, Ghahremani S, Rao NP, Martinez-Agosto JA (2017) De novo loss-of-function variants in STAG2 are associated with developmental delay, microcephaly, and congenital anomalies. Am J Med Genet A 173:1319–1327

Nishiyama T (2018) Cohesion and cohesin-dependent chromatin organization. Curr Opin Cell Biol 58:8–14

Pezzi N, Prieto I, Kremer L, Pérez Jurado LA, Valero C, Del Mazo J, Martínez-A C, Barbero JL (2000) STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams–Beuren syndrome deletion. FASEB J 14:581–592

Rice P, Longden I, Bleasby A (2000) EMBOSS: the European molecular biology open software suite. Trends Genet 16:276–277

Riera-Escamilla A, Enguita-Marruedo A, Moreno-Mendoza D, Chianese C, Sleddens-Linkels E, Contini E, Benelli M, Natali A, Colpi GM, Ruiz-Castañé E, Maggi M, Baarends WM, Krausz C (2019) Sequencing of a "mouse azoospermia" gene panel in azoospermic men: identification of RNF212 and STAG3 mutations as novel genetic causes of meiotic arrest. Hum Reprod 34:978–988

Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. J Mol Biol 234:779–815

Shen M-Y, Sali A (2006) Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. Protein Sci 15:2507–2524

Smirin-Yosef P, Zuckerman-Levin N, Tzur S, Granot Y, Cohen L, Sachsenweger J, Borck G, Lagovsky I, Salmon-Divon M, Wiesmüller L, Basel-Vanagaite L (2017) A biallelic mutation in the homologous recombination repair gene SPIDR is associated with human gonadal dysgenesis. J Clin Endocrinol Metab 102:681–688

Ward A, Hopkins J, Mckay M, Murray S, Jordan PW (2016) Genetic interactions between the meiosis-specific cohesin components, STAG3, REC8, and RAD21L. G3 (Bethesda) 6:1713–1724

Webb B, Sali A (2014) Comparative protein structure modeling using MODELLER. Curr Protoc Bioinform 47:5.6.1–5.6.32

Weinberg-Shukron A, Rachmiel M, Renbaum P, Gulsuner S, Walsh T, Lobel O, Dreifuss A, Ben-Moshe A, Zeligson S, Segel R, Shore T, Kalifa R, Goldberg M, King M-C, Gerlitz O, Levy-Lahad E, Zangen D (2018) Essential role of BRCA2 in ovarian development and function. N Engl J Med 379:1042–1049

Wood-Trageser MA, Gurbuz F, Yatsenko SA, Jeffries EP, Kotan LD, Surti U, Ketterer DM, Matic J, Chipkin J, Jiang H, Trakselis MA, Topaloglu AK, Rajkovic A (2014) MCM9 mutations are associated with ovarian failure, short stature, and chromosomal instability. Am J Hum Genet 95:754–762

Zhang D, Liu Yifeng, Zhang Z, Lv P, Liu Yun, Li J, Wu Y, Zhang R, Huang Y, Xu G, Qian Yeqing, Qian Yuli, Chen S, Xu C, Shen J, Zhu L, Chen K, Zhu B, Ye X, Mao Y, Bo X, Zhou C, Wang T, Chen D, Yang W, Tan Y, Song Y, Zhou D, Sheng J, Gao H, Zhu Y, Li M, Wu L, He L, Huang H (2018) Basonuclin 1 deficiency is a cause of primary ovarian insufficiency. Hum Mol Genet 27:3787–3800

Zhou Y, Qin Yan, Qin Yingying, Xu B, Guo T, Ke H, Chen M, Zhang L, Han F, Li Y, Chen M, Behrens A, Wang Y, Xu Z, Chen Z-J, Gao F (2018) Wdr62 is involved in meiotic initiation via activating JNK signaling and associated with POI in humans. PLoS Genet 14:e1007463. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007463

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Première réplication de *SPIDR*, un nouveau gène de réparation d'ADN dans une IOP isolée.

Article 4: A SPIDR homozygous nonsense pathogenic variant in isolated primary ovarian insufficiency with chromosomal instability

Abdelkader Heddar, Nathalie Guichoux, Nathalie Auger, Micheline Misrahi
Clin Genet. 2022 Feb;101(2):242-246. doi: 10.1111/cge.14080. Epub 2021 Nov 9

3.4 A SPIDR HOMOZYGOUS NONSENSE PATHOGENIC VARIANT IN ISOLATED PRIMARY OVARIAN INSUFFICIENCY WITH CHROMOSOMAL INSTABILITY

Clin Genet. 2022 Feb;101(2):242-246. doi: 10.1111/cge.14080. Epub 2021 Nov 9

SPIDR est un gène qui code une protéine identifiée récemment en 2013 grâce à des techniques de co-immunoprécipitation, par deux équipes qui recherchaient des partenaires ou des molécules qui interagissent avec BLM ou RAD51, deux protéines majeures impliquées dans la réparation d'ADN (Wan *et al.*, 2013; Yuan and Chen, 2013). En effet, Il a été proposé que la protéine codée par *SPIDR* assure une connexion entre ces deux acteurs majeurs de la réparation d'ADN (Figure 13) (Wan *et al.*, 2013; Yuan and Chen, 2013). Néanmoins, le rôle précis de SPIDR est encore inconnu. Récemment, une famille consanguine avec deux sœurs porteuses d'une mutation homozygote de SPIDR a été rapportée (Smirin-Yosef *et al.*, 2017). Cependant, aucune étude cytogénétique n'a été réalisée, et des résultats contradictoires sur l'impact fonctionnel de cette mutation *in vitro* ont été obtenus à partir des cellules lymphoblastiques des deux sœurs (Smirin-Yosef *et al.*, 2017). En effet, la recombinaison homologue était augmentée chez l'une et diminuée chez la deuxième (Smirin-Yosef *et al.*, 2017). Ainsi, aucune conclusion claire sur le mécanisme d'action de SPIDR ou son rôle dans l'IOP n'a pu être obtenue (Smirin-Yosef *et al.*, 2017). Dans cet article, nous rapportons la première confirmation de l'implication *in vivo* de SPIDR dans l'IOP mais également des orientations

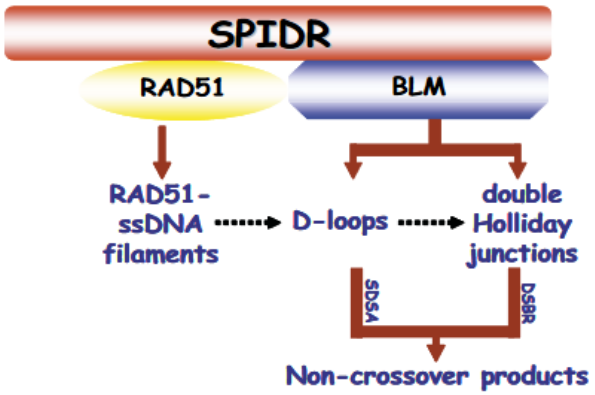


Figure 13 : Modèle proposé pour la fonction de SPIDR dans la réparation de l'ADN. Adaptée de Wang et al., 2013

fonctionnelles à partir de l'étude cytogénétique effectuée dans les cellules de la patiente. En effet, chez une patiente issue d'une famille consanguine d'origine indienne présentant une IOP isolée, avec aménorrhée primaire et absence de développement pubertaire, nous avons identifié une nouvelle mutation non-sens homozygote de *SPIDR* (c.814C>T; p.Arg272Ter). Cette mutation est responsable vraisemblablement de la dégradation de l'ARN messager correspondant par le système NMD. Cette mutation est très rare dans les différentes bases de données et décrite uniquement à l'état hétérozygote avec une fréquence de 3.68×10^{-5} dans la base GnomAD Exome et de 3.22×10^{-5} dans la base Kaviar. Sur le plan cytogénétique, nous avons démontré que les cellules de la patiente ont une fragilité chromosomique supérieure par rapport à des cellules contrôles en présence d'un agent intercalant, la MMC. Ceci reflète une réparation altérée de l'ADN double brin. Cependant, l'étude des échanges entre chromatides sœurs, un test très pathognomonique des altérations moléculaires dans le syndrome de Bloom ou les syndromes apparentés, n'a pas montré d'anomalie (le nombre des échanges entre chromatides était de 7 par cellule pour une valeur normale de 10-14 alors que dans les cellules d'un patient atteint par le syndrome de Bloom, le nombre d'échanges est supérieure à 30 voire peut atteindre 100 par cellule (Chaganti *et al.*, 1974). D'une manière intéressante, les cellules des souris déficientes *Spidr-/-,* ont également, comme chez notre patiente, un nombre normal d'échanges spontanés entre chromatides sœurs (Prakash *et al.*, 2021). Dans cette dernière étude, les auteurs ont généré des modèles murins invalidés de *Spidr-/-* qui sont viables mais avec des ovaires et des testicules de petite taille (Prakash *et al.*, 2021). De plus, des altérations de la méiose au niveau de la lignée germinale masculine ont été notées (Prakash *et al.*, 2021). Cependant, il n'a pas été précisé si les souris mâles et femelles avaient des problèmes de fertilité (Prakash *et al.*, 2021). Notre étude permet de confirmer le rôle

de *SPIDR* dans l'IOP en agissant vraisemblablement via la voie de RAD51. Ceci permet de proposer un suivi adapté à ces familles. D'autres études sont nécessaires, y compris le dépistage moléculaire de grandes cohortes, pour mieux évaluer le risque de tumeurs/cancers chez les patientes atteintes d'une IOP secondaire à des défauts moléculaires des gènes de réparation de l'ADN, y compris *SPIDR*. Une information adéquate et un suivi à long terme de ces patientes dans une équipe pluridisciplinaire sont nécessaires pour détecter les éventuelles comorbidités. Par ailleurs ce gène a été également impliqué dans l'infertilité masculine chez deux patients (Alhathal *et al.*, 2020).

Check for updates

Received: 26 August 2021 | Revised: 20 October 2021 | Accepted: 21 October 2021
DOI: 10.1111/cge.14080

SHORT REPORT

CLINICAL GENETICS WILEY

A *SPIDR* homozygous nonsense pathogenic variant in isolated primary ovarian insufficiency with chromosomal instability

Abdelkader Heddar[1,2] | Nathalie Guichoux[3] | Nathalie Auger[4] | Micheline Misrahi[1,2]

[1]Université Paris Saclay, Faculté de Médecine; Unité de Génétique Moléculaire des Maladies Métaboliques et de la Reproduction, Hôpitaux Universitaires Paris-Saclay, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France

[2]UMR-S 1193, INSERM, Université Paris Saclay, Faculté de Médecine, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

[3]Service de Pédiatrie et des Urgences Pédiatriques, Hôpital Ambroise-Paré, Hôpitaux Universitaires Paris-Saclay, Boulogne-Billancourt, France

[4]Département de Biologie et de Pathologie, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

Correspondence
Micheline Misrahi, Faculté de Médecine Paris Saclay, Hôpital Bicêtre, 94275, Le Kremlin-Bicêtre, France.
Email: micheline.misrahi@aphp.fr

Funding information
Agence de Biomédecine, Grant/Award Number: PFS12-002; Assistance Publique Hôpitaux de Paris-APHP, University Paris-Saclay

Abstract

Primary ovarian insufficiency (POI), affecting 1% of women under 40 years is a public health problem. Genes involved in meiosis/DNA repair were recently shown to be the leading family of associated causal genes, some of them also cause tumors/cancers. Here, using targeted next-generation sequencing in an Indian POI patient with primary amenorrhea and streak ovaries, we identified a novel homozygous nonsense variant in exon 7 of *SPIDR (KIAA0146)* c.814C > T, R272*, predicted to lead a nonsense-mediated mRNA decay. SPIDR was recently identified by in vitro assays as an auxiliary protein interacting with RAD51 and BLM, two major proteins involved in genome stability. Consistent with alteration of the RAD51 pathway, we observed a strong increase in mitomycin C-induced DNA breaks and aberrant metaphases in the patient's cells compared to a control. However, sister chromatid exchanges were normal in contrast to the sharp increase characteristic of the BLM pathway. This is the first evidence of chromosomal instability associated with a SPIDR molecular defect, which supports the role of SPIDR in double-stranded DNA damage repair in vivo in humans and its causal role in POI. Our study increases knowledge on the SPIDR function and has broad implications in the management of such patients.

KEYWORDS
chromosomal instability, DNA repair, mitomycin C, mutation, primary ovarian insufficiency, sister chromatid exchange, SPIDR

1 | INTRODUCTION

Primary ovarian insufficiency (POI) affects ~1% of women under 40 years[1] frequently leading to definitive infertility. This is a public health problem. To date ~70% of cases remain idiopathic.

Homologous recombination (HR) is an evolutionarily conserved process essential to genome stability and cell viability in meiotic and mitotic cells. Consequently, HR-deficient organisms generally share genetic instability and sterility. The central components of HR are RAD51, essential for meiotic and mitotic cells, and DMC1 specific for meiosis. Several mediators and regulator molecules are critical for HR, such as BRCA2, PALB2, and MCM8/9. More than 80 genes causing POI have been reported to date,[1] especially through next generation sequencing (NGS), particularly whole exome sequencing (WES), with a high genetic heterogeneity. The meiosis/DNA repair gene family[1] is a leading family of associated causal genes, comprising 70% of genes identified to date by WES in isolated POI. We recently showed that mutations of *FANCM*,[2] involved in the Fanconi anemia (FA) pathway, and *BRCA2*, a major gene involved in breast and ovarian cancers, also cause fully isolated POI.[3] Furthermore, we have shown that mutation of *MCM8*, a DNA repair gene, causes POI[1] associated with pilomatricomas (skin tumors).[4] This allowed to establish a strong link between infertility and tumors/cancers and, therefore, markedly change the genetic counseling and management of POI patients.

Here, we studied a patient from an Indian family who presented with isolated POI. We identified a novel homozygous nonsense pathogenic variant of *SPIDR*, encoding a newly discovered auxiliary protein

 © 2021 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

13990004, 2022, 2, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cge.14080 by Inserm Dist Ist, Wiley Online Library on [06/11/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

of *HR*, and reported the first evidence of chromosomal instability related to a *SPIDR* molecular defect.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients

The Indian patient was referred to us for primary amenorrhea and delayed puberty (Figure 1A). The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approvals and informed consents were obtained from all institutions and subjects involved.

2.2 | Targeted next-generation sequencing

A custom-made targeted NGS study, including all known POI genes,[1] was performed for the patient (Figure 1A, II.2) (see Reference [1] for the list of genes included in the panel). Variants were classified according to the American College of Medical Genetics (ACMG) guidelines using the VarSome website (https://varsome.com).

2.3 | Chromosomal breakage studies

Chromosomal breakage studies were performed on cultured peripheral lymphocytes from the patient and a healthy control, as described.[2–4]

2.4 | Sister chromatid exchange-(SCE) assay

SCE assays were performed on the patient's fresh peripheral blood lymphocytes as described.[5]

3 | RESULTS

3.1 | Clinical data and medical history

The pedigree of the consanguineous Indian family is presented in Figure 1. At birth (40 weeks of gestation), the proband II.2 weighed 3480 g, her height was 52 cm, and she had a normal head circumference of 33 cm. At age 15 years, she developed primary amenorrhea and delayed puberty. Her auxological parameters were as follows: height 168 cm (+1 SD), weight 54 kg (0 SD), and BMI 19 kg/m^2 (0 SD). Her

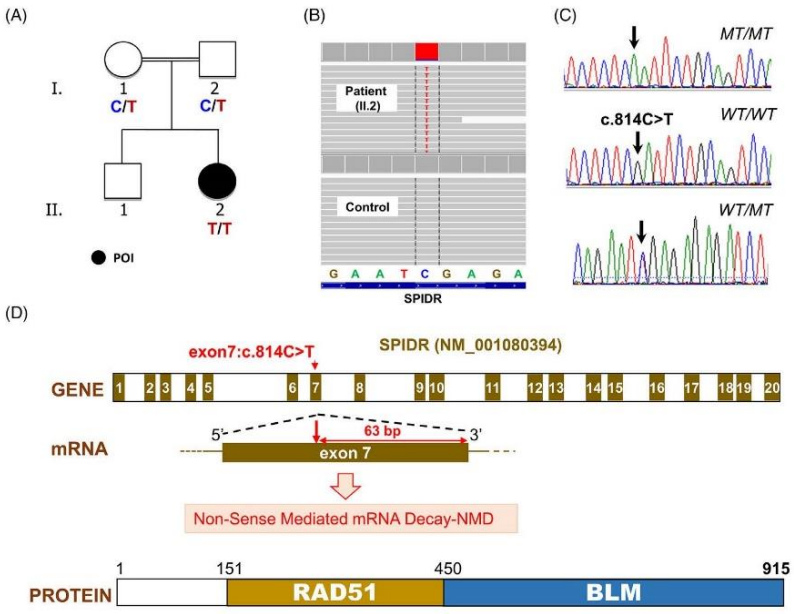


FIGURE 1 Pedigree of the family with *SPIDR* mutation and molecular analysis. (A) Pedigree of the family. Double lines: consanguineous unions. The proband was analyzed by targeted NGS. The genotype of *SPIDR* is indicated: normal (WT) allele in blue, mutated allele in red. (B) Visualization of NGS data in IGV (Integrative Genomics Viewer). Coverage of at least 150X in the patient (on top) and the healthy control (below). (C) Sanger sequencing electropherograms showing the *SPIDR* mutation. MT: mutated. WT: wild type. (D) On top: Structure of *SPIDR* with coding exons as colored bars (references NM: 001080394) and position of the pathogenic variant in the genomic sequence. According to the 50 bp rule[11] the mutated mRNA should undergo NMD. Below: Structure of the normal protein. The two RAD51 and BLM interacting domains are shown (see Reference [6]) [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

13990004, 2022, 2, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cge.14080 by Inserm Dsc Ist, Wiley Online Library on [06/11/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

TABLE 1 Clinical, biological and ultrasonographical studies of the proband

Case	Menstrual cycles	Age at evaluation (years)	BMI (height cm/ weight kg)	Ovaries	FSH IU/l	LH IU/l	E2 pg/ml	AMH pmol/l	InhB pg/ml	T nmol/l	17 OHP nmol/l	PRL µg/l	TSH mU/l
Proposita	Primary amenorrhea	15	19 (168/54)	Not visualized	132	48	<5	-	-	-	0.91	7.6	1.45
		16			152	51	-	<0.3	<2	0.7	1.4	8.7	2.57

Abbreviations: BMI, body mass index; FSH, Follicle-stimulating hormone; LH, Luteinizing hormone; E2, estradiol; AMH, anti-Müllerian hormone; InhB, inhibine B. Normal values: AMH, 6.4–77 pmol/L; Inhibine B, 9–110 pg/ml; PRL (µg/L), 4.8–23.3; testosterone (nmol/L), 0.35–2.4; TSH (mU/L), 0.27–4.20. Respectively, for follicular, ovulatory, luteal phases and menopause: FSH (IU/l): (3.5–12.5), (4.7–21.5), (1.7–7.7), (25.8–135); LH: (IU/l) (2.4–12.6), (14–95.6), (1–11.4), (8–58.5); E2 (pg/ml): (12–233), (41–398), (22–341), (≤5).17 OHP (nmol/L): (1–4.5); (0.8–8.8); (0.6–5.8); (0.6–2.2).

Tanner score was A2P4M1. She had a 3-year bone age delay. The patient had no other clinical signs. Hormonal assays confirmed POI with high FSH (132 IU/L) and luteinizing hormone (LH) (48 IU/L) and low estradiol (E2) (<5 pg/ml) plasma levels confirmed on a second hormonal assay 6 months later. AMH was very low (<0.3 pmol/L) (see Table 1). The karyotype was 46, XX and FMR1 was normal. At 16 years, pelvic ultrasonography (US) and magnetic resonance imaging (MRI) did not visualize ovaries and revealed a small uterus. Hormone replacement therapy was started. The patient had a 20-year-old brother who had normal puberty. There was no familial history of POI, autoimmune disease, or cancer. The father was treated for ulcerative colitis.

3.2 | Targeted next generation sequencing

Variant filtering is summarized in Table S1.The only relevant pathogenic variant was a homozygous nonsense variant in exon 7 of *SPIDR* (c.814C > T, R272*), confirmed by Sanger sequencing (Figure 1C). This pathogenic variant has a Minor Allele Frequency of 3.68×10^{-5} in the Exome GnomAD database and 3.22×10^{-5} in the Kaviar database, with only reported heterozygous variants, and is absent from other human databases.

The corresponding transcript could be degraded by nonsense-mediated mRNA decay (NMD). Alternatively, the deduced protein could be truncated of the 644 C-terminal residues of the protein including half of the RAD51 interacting domain and the whole BLM interacting domain (Figure 1D). According to the "50-bp rule"[11] (Figure 1D), the mutated mRNA is predicted to be degraded by NMD.

3.3 | Increased mitomycine-induced chromosomal instability in the patient's cells

Hypersensitivity to the chromosome breaking effect of crosslinking agents is a reliable marker for studying HR efficiency and the RAD51 pathway.[2,3] Few spontaneous breaks were observed in the proposita's cells under basal conditions (Table S2). With 100 nM of mitomycine (MMC), the number of breaks in the patient's cells was 20 times greater than for a control (Table S2, Figure 2A). Furthermore, at high MMC concentration (1000 nM), while only 16% of the control (WT) cells presented breaks, all the patient's cells (100%) presented at least 20 breaks per metaphase (Table S2). Our data indicates that the patient's cells displayed a marked increase in MMC-induced chromosomal breaks compared to WT cells.

3.4 | Sister chromatid exchanges

Bloom syndrome (BS) is a rare disorder, caused by biallelic alterations of *BLM* encoding a DNA helicase that unwinds single- and double-stranded DNA, contributing to the maintenance of genome stability. A pathognomonic feature of the syndrome is increased spontaneous SCE (a mean of 40–100 SCE/cell). As SPIDR connects RAD51 to

13990004, 2022, 2, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cge.14080 by Inserm Dist Ist, Wiley Online Library on [06/11/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

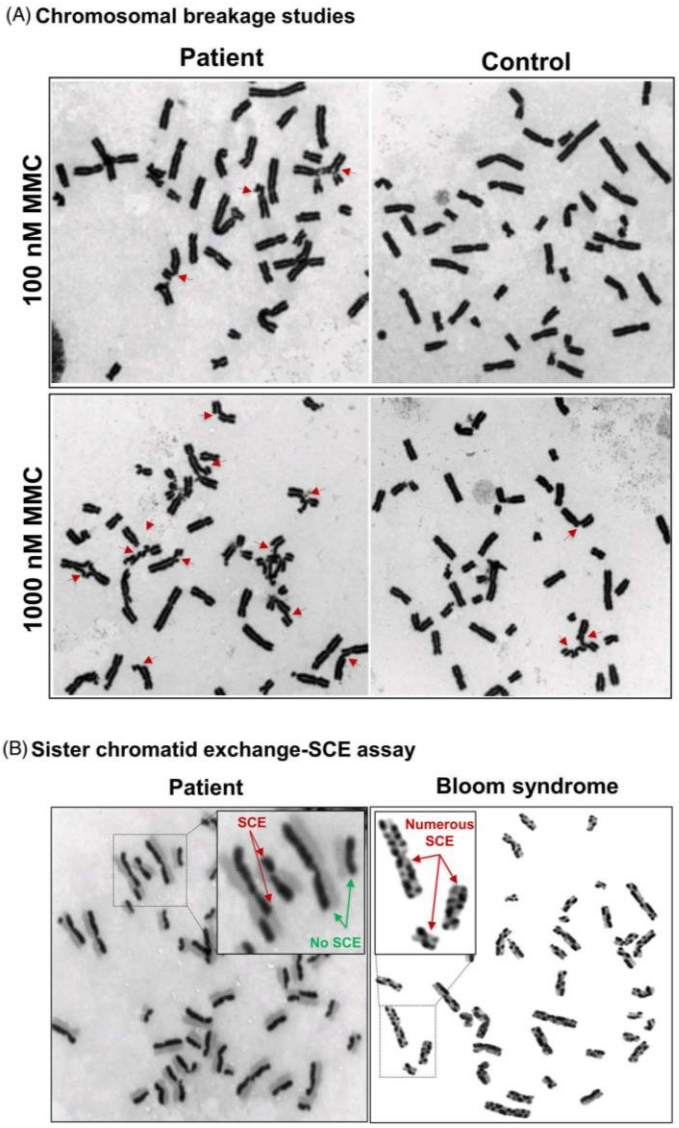


FIGURE 2 Chromosomal studies. (A) Chromosomal breakage studies: MMC-induced chromosomal breakages were performed in cultured lymphocytes from the patient and a healthy control. On top 100 nM MMC were used, and below 1000 nM. A minimum of 20 metaphases were scored for each sample. Arrows indicate breakages and chromosomal rearrangements. (B) Sister-chromatid exchanges in the patient with POI (on the left) compared to a patient with Bloom syndrome (on the right). The patient's cells do not exhibit increased SCE ($N = 7$) compared to cells of a patient with a Bloom syndrome (>80) [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

BLM[6] in vitro, we speculated that a SPIDR defect might also alter the BLM pathway.[5] The patient's cells presented a mean of five SCEs/metaphase, which is a normal average (*N*: 1–14; Figure 2B).[7] This result markedly differs from what is observed in BS.

4 | DISCUSSION

SPIDR is a protein recently identified by a tandem affinity purification assay performed for the identification of proteins interacting with BLM and RAD51 in 293T cells.[6] SPIDR also interacts with the Shu complex, an evolutionarily conserved complex from yeast to human that regulates the activity of RAD51 and thus HR.[6,8,9] Few studies have been performed on SPIDR and none in vivo. The role of SPIDR in humans remains unknown.

A single homozygous nonsense pathogenic variant of SPIDR was previously identified in two sisters from a consanguineous Israeli Muslim Arab family displaying POI with delayed puberty.[10] No cytogenetic studies were performed and contradictory results concerning HR were observed in the two sisters lymphocytes: either normal or increased. Therefore, the role of SPIDR remained unknown.

13990004, 2022, 2, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cge.14080 by Inserm Dsc Ist, Wiley Online Library on [06/11/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

In this study, we revealed a novel pathogenic variant of *SPIDR* in a patient born to consanguineous Indian parents displaying a severe phenotype with non-syndromic POI, primary amenorrhea and streak ovaries. A strong increase in MMC-induced chromosomal breaks per cell was observed compared to a control. Furthermore, the pathogenic variant of our patient (R270*) is in strict vicinity to the variant previously reported: W280*. Both variants are located in the same predicted functional domain. They are deduced to yield either a truncated protein or degradated mRNAs by NMD. Phenotypically, both our patient and the two sisters previously reported with homozygous variants of SPIDR had a similar phenotype of isolated POI. These findings support a causal role of the *SPIDR* pathogenic variant in the POI of our patient through altered double-stranded DNA break repair. BLM stability and function did not appear to be affected by the alteration of the SPIDR function as the pathognomic feature of BS, that is, increased spontaneous SCE, was not observed in our patient. Inactivation of three out of four proteins of the Blm Top3a Rmi1 Rmi2 (BTRR) complex, which includes BLM, topoisomerase III alpha (TOP3A), and ReQ-mediated genome instability proteins 1 and 2 (RMI1 and RMI2), is associated with spontaneously increased SCE.[7] For molecular defects of RAD51 auxiliary proteins, and BRCA2 or FANCM, both involved in the RAD51 pathway, no spontaneous increase in SCE occured.[12]

Our findings show that inactivation of SPIDR results in an alteration in double-stranded DNA break repair, similar to alteration of the RAD51 pathway. Interestingly, these results are intermediate between the chromosomal instability detected in our previously described patients with isolated POI and R2842C-BRCA2 or Q1871X-FANCM homozygous pathogenic variants (Table S3).[2,3] Our patient's phenotype is consistent with those of the latter patients, with isolated POI, primary amenorrhea, and streak ovaries, but without visible somatic pathology. However, *FANCM* and *BRCA2* molecular defects also cause tumors or cancers. An increased risk of tumors/cancers associated with *SPIDR* pathogenic variants cannot be excluded. Adequate information and long-term follow-up of these patients within a multidisciplinary team are necessary to prevent or detect eventual comorbidities in particular tumors/cancers.

In conclusion, we have identified a novel homozygous nonsense pathogenic variant of SPIDR in an Indian patient with isolated POI. We show for the first time that a SPIDR molecular defect results in a strong increase in chromosomal instability. Our study increases knowledge on the role of SPIDR in double stranded DNA repair and confirms its causal role in POI. This enables appropriate monitoring to be offered to these families. The molecular screening of large cohorts is warranted to better assess the risk of tumors/cancers in such patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank for helpful discussions Dr Bernard S Lopez, INSERM U1016, UMR 8104 CNRS, Cochin institute, France.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data are available upon request to the corresponding author M.M.

ORCID

Micheline Misrahi https://orcid.org/0000-0002-5379-8859

REFERENCES

1. Huhtaniemi I, Hovatta O, La Marca A, et al. Advances in the molecular pathophysiology, genetics, and treatment of primary ovarian insufficiency. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29(6):400-419. doi:10.1016/j.tem.2018.03.010
2. Fouquet B, Pawlikowska P, Caburet S, et al. A homozygous FANCM mutation underlies a familial case of non-syndromic primary ovarian insufficiency. *Elife*. 2017;6. doi:10.7554/eLife.30490
3. Caburet S, Heddar A, Dardillac E, et al. Homozygous hypomorphic BRCA2 variant in primary ovarian insufficiency without cancer or Fanconi anaemia trait. *J Med Genet*. 2020;58(2):125-134. doi:10.1136/jmedgenet-2019-106672
4. Heddar A, Beckers D, Fouquet B, Roland D, Misrahi M. A novel phenotype combining primary ovarian insufficiency growth retardation and pilomatricomas with MCM8 mutation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(6):1973-1982. doi:10.1210/clinem/dgaa155
5. Stults DM, Killen MW, Marco-Casanova P, Pierce AJ. The sister chromatid exchange (SCE) assay. *Methods Mol Biol*. 2020;2102:441-457. doi:10.1007/978-1-0716-0223-2_25
6. Wan L, Han J, Liu T, et al. Scaffolding protein SPIDR/KIAA0146 connects the bloom syndrome helicase with homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(26):10646-10651. doi:10.1073/pnas.1220921110
7. Taylor AMR, Rothblum-Oviatt C, Ellis NA, et al. Chromosome instability syndromes. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):64. doi:10.1038/s41572-019-0113-0
8. Yuan J, Chen J. FIGNL1-containing protein complex is required for efficient homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(26):10640-10645. doi:10.1073/pnas.1220662110
9. Martino J, Brunette GJ, Barroso-González J, et al. The human Shu complex functions with PDS5B and SPIDR to promote homologous recombination. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(19):10151-10165. doi:10.1093/nar/gkz738
10. Smirin-Yosef P, Zuckerman-Levin N, Tzur S, et al. A Biallelic mutation in the homologous recombination repair gene SPIDR is associated with human gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(2):681-688. doi:10.1210/jc.2016-2714
11. Nagy E, Maquat LE. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci*. 1998;23(6):198-199. doi:10.1016/s0968-0004(98)01208-0
12. Rosado IV, Niedzwiedz W, Alpi AF, Patel KJ. The Walker B motif in avian FANCM is required to limit sister chromatid exchanges but is dispensable for DNA crosslink repair. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(13):4360-4370. doi:10.1093/nar/gkp365

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Heddar A, Guichoux N, Auger N, Misrahi M. A *SPIDR* homozygous nonsense pathogenic variant in isolated primary ovarian insufficiency with chromosomal instability. *Clinical Genetics*. 2022;101(2):242-246. doi:10.1111/cge.14080

13990004, 2022, 2, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cge.14080 by Inserm Dsc Ist, Wiley Online Library on [06/11/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Etude d’une large cohorte d’IOP et implication en médecine personnalisée.

Article 5: Genetic landscape of a large cohort of Primary Ovarian Insufficiency: New genes and pathways and implications for personalized medicine

Abdelkader Heddar , Cagri Ogur , Sabrina Da Costa , Inès Braham, Line Billaud-Rist, Necati Findikli, Claire Beneteau, Rachel Reynaud, Khaled Mahmoud, Stéphanie Legrand, Maud Marchand, Isabelle Cedrin-Durnerin, Adèle Cantalloube , Maeliss Peigne, Marion Bretault, Benedicte Dagher-Hayeck, Sandrine Perol, Celine Droumaguet , Sabri Cavkaytar, Carole Nicolas-Bonne, Hanen Elloumi , Mohamed Khrouf, Charlotte Rougier-LeMasle , Melanie Fradin , Elsa Le Boette , Perrine Luigi , Anne-Marie Guerrot , Emmanuelle Ginglinger, Amandine Zampa, Anais Fauconnier , Nathalie Auger , Françoise Paris, Elise Brischoux-Boucher , Christelle Cabrol , Aurore Brun , Laura Guyon , Melanie Berard , Axelle Riviere, Nicolas Gruchy , Sylvie Odent , Brigitte Gilbert-Dussardier , Bertrand Isidor, Juliette Piard , Laetitia Lambert , Samir Hamamah , Anne Marie Guedj, Aude Brac de la Perriere , Hervé Fernandez , Marie-Laure Raffin-Sanson, Michel Polak, Hélène Letur , Sylvie Epelboin , Genevieve Plu-Bureau , Sławomir Wołczyński, Sylvie Hieronimus , Kristiina Aittomaki , Sophie Catteau-Jonard , Micheline Misrahi

EBioMedicine. 2022 Oct;84:104246. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104246. Epub 2022 Sep 10.

3.5 GENETIC LANDSCAPE OF A LARGE COHORT OF PRIMARY OVARIAN INSUFFICIENCY: NEW GENES AND PATHWAYS AND IMPLICATIONS FOR PERSONALIZED MEDICINE.

EBioMedicine. 2022 Oct; 84:104246. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104246

Malgré l'application massive des nouvelles technologies de séquençage nouvelle génération, la plupart des études publiées à ce jour concernant la génétique de l'IOP, y compris nos précédentes études présentées dans cette thèse, incluent souvent des familles consanguines ou un nombre limité de patientes. Chaque gène est identifié chez des patientes ou des familles isolées soulignant la grande hétérogénéité génétique de ce syndrome (Huhtaniemi *et al.*, 2018a). Par conséquent, l'utilisation des études génétiques dans la pratique clinique actuelle, y compris en France, est limitée. De nombreux cliniciens ne sont pas au fait des avantages d'un diagnostic précoce et étiologique de l'IOP chez les patientes et leurs familles.

Dans ce travail, que nous venons de publier en octobre 2022, nous rapportons les résultats de l'étude génétique de la plus grande cohorte de patientes avec IOP étudiée à ce jour. Pour cela nous avosn utilisé soit un panel ciblé incluant 88 gènes associés à l'IOP et qui interveiennt dans differnets stades de la folliculogénèse comme illustré dans la figure 14 ou le séquençage de l'exome. Cette cohorte inclut 375 patientes présentant une aménorrhée primaire (24.8%), secondaire (65.3%) ou une spanioménorrhée (9.9%), avec des origines ethniques différentes mais essentiellement européenne (61.9%) et majoritairement sporadique (73.3%). Pour les formes familiales ou avec une consanguinité avérée ou suspectée (n=30), nous avons poursuivi par l'étude de l'exome à la recherche de nouveaux gènes non inclus dans notre panel initial.

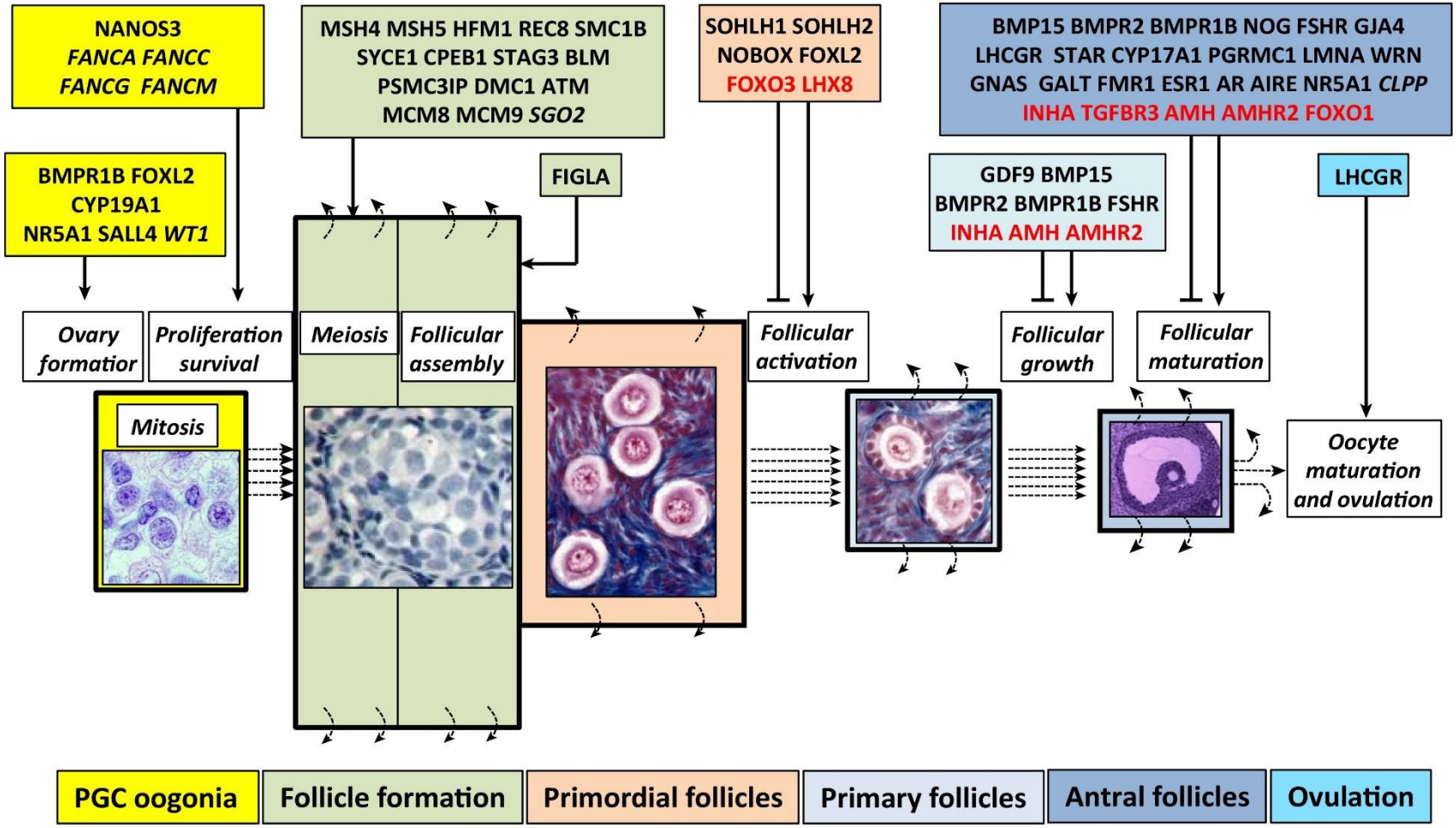


Figure 14 : Gènes impliqués dans l'IOP inclus dans le panel NGS et leurs rôles au niveau de la folliculogénèse. adapté de (Huhtaniemi *et al.*, 2018a), Voir Annexe.

Nous pouvons résumer les résultats de notre étude en 4 points essentiels : 1) rendement diagnostique de l'étude génétique de l'IOP, 2) définition de l'architecture génétique de l'IOP, 3) implication pour la prise en charge des patientes et 4) identification de nouveaux gènes et de nouvelles voies moléculaires. Ce travail offre une opportunité de clarifier l'architecture génétique de l'IOP ce qui est essentiel pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et conduire à une médecine personnalisée.

1. Rendement diagnostique :

Nous démontrons ici dans cette grande cohorte de 375 patientes que le diagnostic génétique par NGS est un outil efficace pour le diagnostic étiologique de l'IOP même en l'absence de consanguinité ou de forme familiale. En utilisant les critères de classification des variants de l'ACMG (Richards *et al.*, 2015), le rendement diagnostique de notre panel, en incluant uniquement les variants pathogènes ou probablement pathogènes des gènes connus impliqués dans l'IOP, était de 29,3 % dans l'ensemble de la cohorte et de 26,3 % dans la population européenne (232 patients). Ce rendement diagnostique est largement supérieur à celui de la prémutation de *FMR1* (3-5%) ou du caryotype (7-10%), souvent les seuls examens réalisés en routine pour ces patientes (European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI *et al.*, 2016; Huhtaniemi *et al.*, 2018a). Les précédentes études incluent souvent soit des petites cohortes (20-60 patients), ou un nombre très limité de gènes étudiés (n=18)(Bouilly *et al.*, 2011; Eskenazi *et al.*, 2021), soit rapporte des variants hétérozygotes dont la pathogénicité n'a pas pu être formellement démontrée, en l'absence d'argument fonctionnel ou de ségrégation suffisants (Gorsi *et al.*, 2021). Le rendement de ces études est variable allant de 33 à

50%. Cependant, certains variants publiés dans ces études se sont révélés très fréquents dans certaines populations et donc ont été considérés à tort comme pathogènes (Heddar and Misrahi, 2022; Rouen *et al.*, 2022). Ainsi et contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature où on estime à 70-80% des IOP comme d'origine indéterminée, notre étude permet d'identifier une étiologie génétique dans environ 30% des cas. S'ajoutant au rendement du caryotype 7-10% (Huhtaniemi *et al.*, 2018a) et des prémutations du gène *FMR1* (3-5%) (Huhtaniemi *et al.*, 2018a), une étiologie génétique pouvant donc être identifiée dans 50% des cas. Une étude génétique approfondie devrait être proposée à toute patiente avec IOP sans étiologie identifiée en pratique clinique courante.

2. Définition de l'architecture génétique de l'IOP

Notre étude confirme la grande hétérogénéité génétique de l'IOP. En effet, la plupart des gènes mutés ont été identifiés chez des patientes isolées. Néanmoins, dix-sept (17) gènes sont impliqués chez au moins 3 patientes. L'étude de cette large cohorte nous a permis d'établir la proportion de différents groupes de gènes impliqués dans l'IOP. Ces gènes font partie de plusieurs voies moléculaires avec cependant deux voies majoritaires, la méiose et la réparation d'ADN (37.4%), la croissance folliculaire (35.4%) puis en troisième position les gènes du métabolisme ou de fonction mitochondriale (19%). Les autres gènes sont impliqués dans le développement ovarien (6,1 %), l'immunité (1,4 %) et l'autophagie (0,7 %).

i) Confirmation de certains gènes responsables dans l'IOP

Nous avons confirmé l'implication de 13 gènes rapportés précédemment chez des patientes ou familles isolées notamment l'implication de deux gènes de la voie Fanconi

que nous avons rapporté précédemment à savoir *FANCM* et *BRCA2* (Fouquet *et al.*, 2017a; Caburet *et al.*, 2020a). Ainsi nous avons confirmé le variant récurrent et pathogène de *FANCM* (NM_020937.4:c.5101C>T p.Gln1701Ter) soit à l'état homozygote (1 patiente) ou hétérozygote composite (2 patientes) avec deux autres variants non rapportés à ce jour. Une deuxième patiente présentant une aménorrhée primaire est porteuse à l'état homozygote d'un variant pathogène de *BRCA2* (NM_000059.4: c.8350C>T :p.Arg2784Trp). La patiente ne présente aucun signe clinique de l'AF. Selon l'étude de Mesman et al, ce variant à une activité résiduelle de 15% ce qui peut expliquer, comme chez la patiente que nous avons rapportée précédemment avec le variant homozygote de *BRCA2* (R2842C), l'absence de manifestation somatique (Mesman *et al.*, 2019; Caburet *et al.*, 2020a). Nous avons également retrouvé un nouveau variant tronquant homozygote de *MSH4* (NM_002440.4:c.2198C>A : p.Ser733Ter), un gène impliqué dans la réparation de l'ADN par le système MMR précédemment rapporté dans une famille unique d'IOP (Carlosama *et al.*, 2017) et avons confirmé son implication dans l'IOP. Les autres gènes confirmés par cette étude sont impliqués soit dans la réparation d'ADN (n=3), la croissance folliculaire (n=4), l'autophagie (n=1), le métabolisme des protéines (n=1) et le développement des gonades (n=1).

Par ailleurs nous avons identifié des nouveaux variants dans des gènes connus dans l'IOP. A titre exemple, nous avons identifié 5 variants pathogènes de *STAG3* (deux variants avec un décalage de cadre de lecture, un variant d'épissage, une délétion en phase et une délétion intragénique cryptique emportant les exons 7 à 15), soit à l'état homozygote ou hétérozygote composite chez 5 patientes dont deux sœurs. Le phénotype est toujours identique aux publications précédentes à savoir une

aménorrhée primaire et des ovaires petits sans follicule (cf. paragraphe sur l'article *STAG3*). Chez cinq patientes, nous avons identifié 6 variants faux-sens et un codon stop du gène *FSHR*, codant le récepteur de la FSH, chez 5 patientes (dont deux sœurs) soit à l'état homozygote (n=1) ou hétérozygote composite (n=4). Les patientes présentaient soit une aménorrhée primaire ou secondaire mais toutes avaient une réserve ovarienne conservée avec une AMH entre 3 et 4 ng/ml et un compte folliculaire pouvant atteindre 30/ovaire, un tableau très typique des mutations bi-alléliques du récepteur de la FSH (Meduri *et al.*, 2003; Huhtaniemi *et al.*, 2018a).

ii) Remise en cause de la fréquence de certains gènes identifiés par stratégie gène-candidat

La stratégie gène-candidat, en se basant sur les modèles murins correspondant, a permis de révéler un certain nombre de gènes impliqués dans l'IOP comme par exemple *NOBOX*, *BMP15* et *GDF9*, des protéines impliquées dans la croissance folliculaire. Le séquençage de ces gènes dans des cohortes de patientes avec IOP a rapporté des variants comme pathogènes avec une fréquence allant de 6 à 11% (Bouilly *et al.*, 2011, 2016; Eskenazi *et al.*, 2021). Dans notre étude, nous n'avons pas pu confirmer la forte implication de ces gènes dans l'IOP. Nous avons identifié un seul variant tronquant à l'état hétérozygote de *NOBOX* (NM_001080413.3:c.138C>A: p.Tyr46Ter) chez deux patientes avec aménorrhée secondaire, dont l'une est issue d'une familiale d'IOP. La ségrégation familiale de ce variant nous a permis de confirmer son implication chez toutes les femmes atteintes d'IOP dans cette famille sur trois générations. Ce variant pathogène de *NOBOX*, identifié donc chez 5 patientes de cette cohorte, n'est responsable que de 1.3% (5/375) de cas d'IOP. La différence de nos résultats par rapport aux précédentes

publications peut être expliquée par une surestimation de la pathogénicité de certains variants. Par exemple, le variant p.Arg117Trp de *NOBOX*, rapporté dans des études précédentes comme pathogène, a une fréquence élevée jusqu'à 8,17 % dans la population africaine dans les bases de données GnomAD Exome et Génome (Bouilly *et al.*, 2011, 2016; Eskenazi *et al.*, 2021). Il s'agit donc d'un polymorphisme.

Par ailleurs, nous avons pu confirmer que l'héritabilité des variants de ces gènes de la croissance folliculaire est à la fois dominante et récessive avec vraisemblablement une corrélation génotype-phénotype entre le type de l'altération moléculaire et le phénotype des patientes. Nous avons rapporté une famille d'origine finlandaise dans laquelle trois sœurs ont présenté une aménorrhée primaire avec des ovaires atrophiques sans follicules. Le panel NGS nous a permis d'identifier chez les trois sœurs une troncature homozygote de *GDF9* (NM_005260.5:c.1238_1241delCAGT : p.Ser413CysfsTer14). Il s'agit de la deuxième mutation tronquante homozygote de *GDF9*. Par ailleurs, chez une autre patiente d'origine Européenne présentant une aménorrhée secondaire dès l'âge de 17 ans, nous avons mis en évidence deux variants hétérozygotes composite du gène *GDF9* (NM_005260.5: c.794T>G: p.Leu265Ter et c.1094T>C :p.Leu365Pro).

Au total, nos données remettent en question la forte prévalence des mutations de *NOBOX* et *GDF9* comme des gènes décrits comme majoritaires dans l'IOP. L'héritabilité des mutations de ces gènes est à la fois dominante et récessive avec probablement une corrélation génotype-phénotype (Qin *et al.*, 2007; França *et al.*, 2017). Les variants bi-alléliques tronqués de *NOBOX* et *GDF9* sont responsables d'une IOP avec une aménorrhée primaire alors que les variants hétérozygotes de ces gènes principalement des faux sens sont associés à des IOP avec une aménorrhée

secondaire. La famille que nous rapportons ici est en faveur d'une probable haplo-insuffisance de *NOBOX*.

iii) Pas d'argument pour une origine polygénique de l'IOP

Des études antérieures ont émis l'hypothèse d'une héritabilité polygénique voire multigénique de l'IOP dans environ 5 % - 10% des cas (Bouilly *et al.*, 2016). Dans notre étude, nous ne confirmons pas cette hypothèse. Même si 2,8 % des patientes ont un variant pathogène ou probablement pathogène de deux gènes différents, il n'y pas suffisamment d'argument pour incriminer l'association des variants des deux gènes dansvl'origine de l'IOP puisque chaque variant à lui seul est suffisant pour causer cette pathologie. Chez toutes les patientes avec des variants de deux gènes différents, le deuxième variant, identifié à l'état hétérozygote, est impliqué dans des formes récessives d'IOP (*ATM, FANCM, PCCB, PCCA et PMM2*). Par exemple, une patiente a une IOP en rapport avec deux variants bi-alléliques de *FANCM* a également une troncature hétérozygote de *BLM*. De plus, nous avons identifié un variant pathogène de *BMPR1B* connu pour être impliqué dans des formes dominantes d'IOP chez deux sœurs qui ont développé une aménorrhée secondaire à 34 et 37 ans. L'une des deux sœurs a également un variant hétérozygote pathogène de *PCCB*, un gène connu pour être impliqué dans une forme récessive d'IOP syndromique. Il convient de rappeler que chaque exome contient au moins des centaines de variants rares, et qu'il n'est pas surprenant de trouver des variants hétérozygotes pathogènes ou probablement pathogènes dans plus d'un gène d'IOP chez la même patiente. Une étude récente basée sur 6 447 exomes d'Européens sains génétiquement non apparentés de deux ancêtres distincts estime que chaque individu est porteur d'au moins deux variants pathogènes dans des gènes récessifs autosomiques actuellement connus (Fridman *et*

al., 2021). Par conséquent, nous n'avons trouvé aucune preuve d'hérédité di/multigénique d'IOP dans notre cohorte. Des études de ségrégation dans de grandes familles avec IOP ainsi que l'étude *in vivo* par des modèles murins sont nécessaires pour confirmer ou infirmer l'hypothèse polygénique et de préciser sa contribution réelle dans l'IOP.

3. Implication pour la prise en charge des patients

    i) Diagnostic étiologique et répercussion psychologique

Un diagnostic étiologique permet une meilleure acceptation du diagnostic et vraisemblablement une meilleure adhésion à une prise en charge adaptée par les patientes. De plus, l'identification de l'étiologie génétique permet également de préciser le mode de transmission de la maladie et donc le risque de développer une IOP pour les apparentées. Ainsi, cela permet soit de lever une angoisse injustifiée quant à leur pronostic de fertilité pour les non-porteuses du variant pathogène identifié (ou porteuse d'un seul variant hétérozygote d'un gène impliqué dans des formes récessives d'IOP) ou au contraire permettre un diagnostic présymptomatique et donc un diagnostic précoce permettant dans certains cas une préservation de la fertilité et une prise en charge des comorbidités (cf. plus bas). A titre d'exemple, nous avons étudié une forme familiale d'IOP où deux sœurs avaient développé une aménorrhée secondaire tardive à 37 et 39 ans. L'ainée de cette fratrie a eu une fille avant l'âge de 25 ans. Le caractère familial, en l'absence de consanguinité, avait fait suspecter une forme dominante d'IOP ce d'autant plus que certaines études estiment que c'est le mode de transmission le plus prédominant dans cette pathologie (Rossetti *et al.*, 2017). Ceci a été très angoissant pour l'une des patientes et sa fille. Notre étude génétique a permis de révéler qu'il s'agit d'une forme familiale et récessive d'IOP en rapport avec

deux variants hétérozygote composite du gène *PMM2* (NM_000303.3:c.422G>A:p.Arg141His et c.91T>C :p.Phe31Leu). Cela a permis de rassurer la mère et sa fille âgée de 18 ans sur le risque de développer une IOP et donc sur son pronostic de fertilité.

ii) Prédiction de la persistance d'une réserve ovarienne en fonction de l'altération moléculaire identifiée

L'identification de la cause génétique révèle le mécanisme causal impliqué dans l'IOP et pourrait renseigner sur la persistance ou l'altération de la réserve ovarienne. Contrairement à quelques idées reçues, une patiente peut développer une IOP alors que sa réserve est parfaitement conservée. Grace à l'étude génétique on peut distinguer donc deux groupes de patientes ; avec une réserve ovarienne prédite conservée ou avec réserve prédite altérée ou absente. Le conseil thérapeutique sera donc bien différent dans les deux cas. Dans notre étude, 68,4 % de nos patientes ont une réserve ovarienne prédite conservée à un stade précoce en concordance avec le défaut génétique identifié. Ce groupe contient des patientes avec une mutation d'un gène impliqué dans la croissance folliculaire (35,4 %), le métabolisme et les fonctions mitochondriales (19 %), ou l'autophagie (1 patient). Il existe également des patientes avec une altération mineure de certains gènes de réparation de l'ADN (14 %). En effet, des études antérieures ont rapporté des valeurs d'AMH non nulles et même des grossesses chez des patientes présentant des défauts moléculaires de *FANCM*, *ERCC6*, *MEIOB, HSF2BP, BNC1*. Chez toutes ces patientes, les grossesses ont été obtenues à un âge relativement précoce vers 20-25 ans et l'IOP ayant survenue vers 30 ans (Huhtaniemi *et al.*, 2018a). Ceci est concordant avec les modèles murins (Jiao *et al.*, 2021). Dans ce cas une réserve ovarienne peut persister et une préservation

précoce et urgente de la fertilité doit être conseillée pour la patiente et sa famille (sœurs détectées porteuses des anomalies génétiques, en particulier plus jeunes). Cette préservation de la fertilité va permettre d'éviter la dégradation irréversible d'une éventuelle réserve ovarienne résiduelle. En effet des techniques innovantes d'activation de la croissance des petits follicules de la réserve *in vitro* (In Vitro follicular Activation-IVA) se développent et des grossesses ont été obtenues dans des cas d'IOP avec persistance d'une réserve ovarienne (Grosbois *et al.*, 2020) (voir discussion générale). Il est à noter que, de façon concordante, des études histologiques antérieures ont rapporté la présence d'une réserve ovarienne chez 57 % des patientes atteintes d'IOP (Massin *et al.*, 2008).

En revanche, dans le reste de la cohorte, des anomalies majeures des gènes de la méiose/réparation de l'ADN sont retrouvées. Une altération majeure de la réserve ovarienne est prédite avec un très mauvais pronostic de fertilité, comme chez les patientes précédemment rapportées (Huhtaniemi *et al.*, 2018a). Ceci est également confirmé par les modèles animaux correspondants (Jiao *et al.*, 2021). Une orientation rapide de ces patientes vers le don d'ovocytes ou l'adoption pourrait éviter un retard inutile dans leur projet parental. Le diagnostic génétique de toute IOP isolée sans cause identifiée est donc nécessaire au plus tôt une fois le diagnostic d'IOP établi. Il va permettre d'apporter un pronostic de fertilité ultérieur, et de mettre en place une prise en charge adaptée.

iii) Prise en charge des comorbidités en fonction du gène muté

Chez 32 patientes (8,5 % de la cohorte) se présentant initialement comme étant des IOP isolées, nous avons identifié des altérations moléculaires dans des gènes connue

pour être responsable d'atteintes extra-ovariennes autre que le problème de fertilité. On peut distinguer deux types de comorbidités ; a) celle liée au risque tumoral par mutation d'un gène de réparation de l'ADN, b) atteinte extra-ovarienne d'un gène connu pour être impliqué dans des formes syndromiques d'IOP.

a) Risque tumoral lié à une altération moléculaire d'un gène de réparation de l'ADN. Comme dit plus haut, 37.4 % des patientes avec diagnostic génétique étiologique ont une altération d'un gène de méiose ou de la réparation d'ADN. On peut citer par exemple les mutations bi-alléliques de *BRCA2*, *FANCM*, *STAG3*, *MSH4*, *ATM* ou mono-allélique de *ERCC6, BNC1.* Bien que cette famille soit la principale responsable d'IOP, seuls six gènes sont connus à ce jour comme étant responsable ou associés à des tumeurs/cancers dans l'espèce humaine : *BRCA2, FANCM, MCM8, MCM9, PSMC3IP, STAG3* (Zangen *et al.*, 2011; Caburet *et al.*, 2014; Fouquet *et al.*, 2017a; Heddar *et al.*, 2019a; Caburet *et al.*, 2020a; Heddar *et al.*, 2020a; Heddar and Misrahi, 2021).Mais la majorité des souris déficientes d'un gène de réparation de l'ADN ont développé des tumeurs (Jiao *et al.*, 2021). Des études prospectives de cohortes plus grandes de patientes permettront une évaluation plus précise du risque tumoral chez ces patientes. Un conseil génétique de la patiente et de la famille après discussion pluridisciplinaire doit être réalisé avec un suivi à long terme.

b) Formes syndromiques d'IOP présentées comme des IOP isolées. En effet, chez 32 patientes qui se présentaient initialement comme des IOP isolées, nous avons identifié des variants pathogènes dans des gènes responsables d'IOP syndromiques ou l'atteinte d'un organe autre que l'ovaire. Ces gènes sont impliqués soit dans des formes paucisymptomatiques nécessitant une évaluation approfondie soit l'atteinte extra-ovarienne peut avoir une révélation tardive ou la pénétrance et l'expressivité du

gène sont variables. A titre d'exemple chez une patiente avec IOP et aménorrhée secondaire, nous avons identifié un variant homozygote pathogène de *GALT* (NM_000155.4:c.563A>G:p.Gln188Arg). Il s'agit de la mutation la plus fréquente à l'origine d'une galactosémie (Berry, 1993). Il s'agit d'une maladie métabolique grave souvent diagnostiquée à la naissance et mortelle sans traitement spécifique. La réévaluation clinique après le diagnostic moléculaire a révélé une cataracte pendant la petite enfance traitée par chirurgie et des difficultés d'apprentissage dans l'enfance. Ces symptômes sont habituellement retrouvés chez les patientes avec galactosémie ayant survécue à l'âge adulte. Paradoxalement, une étude récente a révélé que les patientes avec galactosémie ont un pronostic de fertilité meilleur par rapport aux autres causes d'IOP. En effet, les chances de grossesse sont de 48% pour les patientes avec galactosémie contre 5% pour les autres causes d'IOP (van Erven *et al.*, 2017; Hagen-Lillevik *et al.*, 2021). Une patiente présentant une aménorrhée secondaire et hypoparathyroïdie s'est révélé porteuse de deux variants tronquants du gène *AIRE* responsable du syndrome APECED, une polyendocrinopathie auto-immune d'origine génétique, qui débute classiquement dans l'enfance et qui associe au moins deux des trois signes cardinaux : une candidose cutanéomuqueuse chronique, une hypoparathyroïdie et une insuffisance surrénale (Maladie d'Addison) (Ahonen *et al.*, 1990; Husebye *et al.*, 2018). Une réévaluation clinique à la lumière de ce diagnostic génétique a été recommandée pour cette patiente.

c) Gènes avec une pénétrance ou une expressivité variable :

Chez un certain nombre de patientes, nous avons identifié des altérations moléculaires dans des gènes connus pour avoir une pénétrance et une expressivité variable. Chez huit patientes, nous avons identifié des altérations moléculaires dans des gènes

associés ou impliqués dans l'hypertension pulmonaire (HTAP) *CAV1*(n=1), *BMPR2* (n=2) ou *BMPR1B* (n=5) (Morrell et al., 2019). *BMPR2* et *BMPR1B* codent un récepteur transmembranaire, membre de la famille des TGFβ et *CAV1* code la cavéoline qui joue un rôle dans la transduction du signal et le trafic vésiculaire (Persani et al., 2014 ; Huang et al., 2018 ; Morrell et al., 2019). Toutes ces protéines sont exprimées à la fois dans les poumons et les ovaires, en particulier dans les cellules de la granulosa, et ont des rôles démontrés ou supposés dans les deux tissus (Persani *et al.*, 2014; Huhtaniemi *et al.*, 2018a; Morrell *et al.*, 2019). Les souris *Cav1-/-* présentent une hypofertilité (Huang *et al.*, 2018). L'absence de signe d'HTAP, en particulier chez les patientes porteuses de variants de *BMPR2,* le gène majeur de l'HTAP*,* peut s'expliquer par le type du variant impliqué, sa localisation au niveau du gène ainsi que sa pénétrance (voir discussion générale). Un autre exemple est celui du gène *POLG*, qui code une ADN polymérase mitochondriale, l'un des premiers gènes décrits comme étant à l'origine d'une IOP syndromique (Luoma *et al.*, 2004). La transmission des mutations de ce gène est la fois autosomique dominante et récessive avec une pénétrance, une expressivité et une sévérité variables (Blok *et al.*, 2009; Hikmat *et al.*, 2017). Au moins 12 phénotypes différents sont associés à ce gène, avec un âge d'apparition allant de la période néonatale jusqu'à 75 ans (Hikmat *et al.*, 2017). Par exemple, le variant hétérozygote Arg955Cys a d'abord été identifié dans des formes syndromiques d'IOP associant une ophtalmoplégie externe progressive avec ou sans syndrome parkinsonien puis identifié dans des formes isolées d'IOP (Luoma *et al.*, 2004; Pagnamenta *et al.*, 2006). Concernant l'IOP, au moins cinq études ont rapporté des familles avec des variants hétérozygotes de *POLG*, dont Y831C que nous rapportons ici, soit dans des formes isolées ou syndromiques avec notamment une ophtalmoplégie externe progressive avec ou sans syndrome parkinsonien (Luoma *et*

al., 2004; Mancuso *et al.*, 2004; Pagnamenta *et al.*, 2006; Hudson *et al.*, 2007; Blok *et al.*, 2009). Dans notre étude, nous avons identifié 7 patientes avec altérations moléculaires de *POLG* et avons pu confirmer que deux variants ségrégent avec le phénotype d'IOP dans deux familles différentes (le variant Y831C et G843R).

L'infertilité peut être l'unique symptômes d'une atteinte multiorganique comme nous venons de le révéler dans cette étude. De même, l'étude de l'infertilité masculine a révélé des résultats similaires. Alhathal *et al* ont constaté que chez 3,1% (9/275 patients), l'infertilité peut être la seule ou la principale expression phénotypique de gènes connus pour provoquer des manifestations multisystémiques chez l'homme (Alhathal et al., 2020). De la même manière, Kraucz et al ont trouvé que 10% (3/29) des patients présentant une infertilité masculine avec azoospermie avaient des variants bi-alléliques de *FANCA* avec seulement des anomalies hématologiques subtiles retrouvées à la NFS et correspondant donc à une anémie occulte de Fanconi (Krausz et al., 2019). Dans tous ces cas, une évaluation complète avec un conseil génétique adapté des patientes et de leurs familles ont été recommandés avec un suivi approprié dans une équipe multidisciplinaire.

4. Identification de nouveaux gènes candidats et de nouvelles voies moléculaires dans l'IOP.

Notre étude montre l'approche puissante de l'exome pour identifier de nouveaux gènes dont certains ont révélé des voies moléculaires non identifiées à ce jour dans l'IOP isolée. Il s'agit notamment du gène *NLRP11* impliqué dans la voie NF-KB dont le rôle dans l'IOP vient d'être rapporté dans un modèle murin (Luo *et al.*, 2022). Cette voie est également impliquée dans la production de TNF-α et d'IL-6 en réponse au

bisphénol A, connu pour être impliqué dans l'IOP d'origine toxique. En concordance avec le modèle murin (Kato *et al.*, 2019), nous rapportons deux variants bi-alléliques d'*ELAVL2* dans une forme familiale d'IOP. Ce gène est impliqué dans les modifications post- traductionnelles des protéines. D'une manière intéressante, ces deux gènes candidats (*ELAVL2 et NLRP11*) ont été récemment associés à l'âge de la ménopause naturelle à partir d'une grande étude d'association génétique impliquant plus de 200.000 femmes (Ruth *et al.*, 2021). Ceci renforce le lien génétique entre IOP et la variation de l'âge de la ménopause (voir discussion générale)(Ruth *et al.*, 2021). Enfin, nous avons identifié une troncature homozygote du gène *SPATA33* qui vient d'être impliqué dans la mitophagie (autophagie dans la mitochondrie) au niveau des cellules germinales des souris males (Zhang *et al.*, 2021). Ces gènes peuvent permettre de mieux comprendre la physiopathologie des IOP et ouvrent la voie au développement de nouvelles cibles thérapeutiques.

Par ailleurs, nous avons confirmé le rôle majeur des gènes de méiose et de réparation d'ADN en rapportant 4 nouveaux gènes : *HROB, SWI5, HELQ* et *CENPE.* Une fragilité chromosomique élevée a été trouvée chez nos patientes avec des troncatures homozygotes de *HROB, HELQ, SWI5.* Pour la patiente avec une troncature homozygote de *HROB*, le nombre des cassures chromosomiques en présence de MMC était presque similaire à celui retrouvé dans l'AF. Cependant, il n'y avait aucun signe d'anémie de Fanconi chez nos patientes (anémie, microcéphalie cancéreuse, petites tailles ou taches café au lait). Cette fragilité chromosomique peut entraîner un risque accru de malignité surtout en présence de facteurs environnementaux aggravants. Un suivi à long terme par une équipe multidisciplinaire est indiqué.

Par ailleurs, nous rapportons également deux gènes de fonction inconnue mais ayant une forte expression gonadique (*CCDC155, CCDC185*). Des modèles de souris sont nécessaires pour confirmer le rôle de ces gènes et le mécanisme physiopathologique impliqué dans l'IOP.

Genetic landscape of a large cohort of Primary Ovarian Insufficiency: New genes and pathways and implications for personalized medicine

Abdelkader Heddar,[a,b] Cagri Ogur,[c,d] Sabrina Da Costa,[e] Inès Braham,[f] Line Billaud-Rist,[g] Necati Findikli,[h,i] Claire Beneteau,[j] Rachel Reynaud,[k] Khaled Mahmoud,[l] Stéphanie Legrand,[m] Maud Marchand,[e] Isabelle Cedrin-Durnerin,[n] Adèle Cantalloube,[o] Maeliss Peigne,[n] Marion Bretault,[p] Benedicte Dagher-Hayeck,[n] Sandrine Perol,[q] Celine Droumaguet,[r] Sabri Cavkaytar,[h,t] Carole Nicolas-Bonne,[u] Hanen Elloumi,[l] Mohamed Khrouf,[l] Charlotte Rougier-LeMasle,[f] Melanie Fradin,[v,w] Elsa Le Boette,[w] Perrine Luigi,[x] Anne-Marie Guerrot,[y] Emmanuelle Ginglinger,[z] Amandine Zampa,[z] Anais Fauconnier,[aa] Nathalie Auger,[bb] Françoise Paris,[cc,dd,ee] Elise Brischoux-Boucher,[ff] Christelle Cabrol,[ff] Aurore Brun,[gg] Laura Guyon,[j] Melanie Berard,[hh] Axelle Riviere,[hh] Nicolas Gruchy,[ii] Sylvie Odent,[v] Brigitte Gilbert-Dussardier,[gg] Bertrand Isidor,[j] Juliette Piard,[ff] Laetitia Lambert,[hh] Samir Hamamah,[ee,jj] Anne Marie Guedj,[kk] Aude Brac de la Perriere,[ii] Hervé Fernandez,[mm,nn] Marie-Laure Raffin-Sanson,[p] Michel Polak,[e] Hélène Letur,[oo,pp] Sylvie Epelboin,[o] Genevieve Plu-Bureau,[q] Sławomir Wołczyński,[qq] Sylvie Hieronimus,[f] Kristiina Aittomaki,[rr] Sophie Catteau-Jonard,[ss] and Micheline Misrahi[a,b]*

[a]Université Paris Saclay, Faculté de Médecine. Unité de Génétique Moléculaire des Maladies Métaboliques et de la Reproduction, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France
[b]UMR-S 1193, INSERM, Université Paris Saclay, Faculté de Médecine, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France
[c]Igenomix Turkey, İstanbul, Turkey
[d]Institute of Science, Department of Bioengineering Yildiz Technical University, İstanbul, Turkey
[e]Service d'Endocrinologie Pédiatrique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, CNR pathologies gynécologiques rares, 75015, Paris, France
[f]Service d'Endocrinologie et de Médicine de la Reproduction, Hôpital Universitaire de Nice, 06200, Nice, France
[g]Service d'Endocrinologie, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin/Port-Royal, 75005, Paris, France
[h]Bahçeci Umut IVF Centre, Altunizade, İstanbul, Turkey
[i]Faculty of Engineering and Architecture, Department of Biomedical Engineering, Beykent University, İstanbul, Turkey
[j]Service de Génétique Médicale, Centre Hospitalier Universitaire Nantes, 44000, Nantes, France
[k]Aix Marseille Université, Assistance-Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM), Service de Pédiatrie multidisciplinaire Hôpital de la Timone Enfants, 13385, Marseille Cedex 05, France
[l]Centre FERTILLIA de Médecine de la Reproduction- Clinique la ROSE, Tunis, Tunisie
[m]Centre de Fertilité - Clinique de l'Atlantique La Rochelle, 17000, La Rochelle, France
[n]Service de Médecine de la Reproduction et Préservation de la Fertilité, hôpital Jean-Verdier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 93143 Bondy, France
[o]Service de Gynécologie et d'Obstétrique, Hôpital Tenon, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, AP-HP. Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie. Université de la Sorbonne, Paris, France
[p]Service d'Endocrinologie, Hôpital Ambroise Paré, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 92100, Boulogne Billancourt, France
[q]Unité de gynécologie médicale, APHP, Hôpital Port-Royal Cochin, 27 Rue du Faubourg Saint-Jacques, Paris 75014, France
[r]Service de Médecine Interne, Hôpital Henri-Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 94000 Créteil, France
[t]Üsküdar University, Faculty of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, İstanbul, Turkey
[u]Service de Gynécologie et d'Obstétrique, Centre Hospitalier Alpes Léman, 74130, Contamine-Sur-Arve, France
[v]Service de Génétique Clinique, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Hôpital Sud, Univ Rennes, CNRS IGDR UMR 6290, Centre de référence Anomalies du développement CLAD-Ouest, ERN ITHACA, 35203, Rennes, France
[w]Service de Génétique Médicale, Centre Hospitalier de Saint Brieuc, 22000, Saint-Brieuc, France
[x]Service d'Endocrinologie-Diabétologie, Centre Hospitalier Antibes Juan Les Pins, 06600, Antibes, France
[y]Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245, CHU Rouen, Department of Genetics and reference center for developmental disorders, FHU G4 Génomique, F-76000 Rouen, France
[z]Service de Génétique, Centre Hospitalier de Mulhouse, 68100, Mulhouse, France
[aa]Service d'Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques, Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne, 42270, Saint-Priest-en-Jarez, France
[bb]Service de génétique des tumeurs. Institut Gustave Roussy, 94805, Villejuif, France

*Corresponding author at: Faculté de Médecine Paris Saclay, Hôpital Bicêtre, 94275, Le Kremlin-Bicêtre, France.
E-mail address: micheline.misrahi@aphp.fr (M. Misrahi).

[cc]Département de Pédiatrie, Unité d'Endocrinologie-Gynécologie Pédiatrique, Hôpital A.-de-Villeneuve, Centre Hospitalier Universitaire Montpellier et Université Montpellier, 34090, Montpellier, France
[dd]Constitutif Sud, Centre de Référence Maladies Rares du Développement Génital, Hôpital Lapeyronie, Centre Hospitalier Universitaire Montpellier, Université de Montpellier, 34090 Montpellier, France
[ee]INSERM 1203, Développement Embryonnaire Fertilité Environnement, Université de Montpellier, 34090, Montpellier, France
[ff]Centre de Génétique Humaine, Université de Franche-Comté, Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, 25000, Besançon, France
[gg]Service de Génétique, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, Université de Poitiers, 86021, Poitiers, France
[hh]Service de Génétique Clinique, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Nancy, F-54000, Nancy, France
[ii]Normandy University, UNICAEN, Caen University Hospital, Department of Genetics, EA 7450 BioTARGen, FHU G4 Genomics, Caen, France
[jj]Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Département de Biologie de la Reproduction, Biologie de la Reproduction/DPI et CECOS, Université de Montpellier, Montpellier, France
[kk]Service d'Endocrinologie et de Maladies Métaboliques, Centre Hospitalier Universitaire Nîmes, Université de Montpellier, 30029, Nimes, France
[ll]Fédération d'Endocrinologie, Centre de Référence des Maladies Rares du Développement Génital, Groupement Hospitalier Est, Hôpital Louis Pradel, 69002, Lyon, France
[mm]Service de Gynecologie et d'Obstétrique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Faculté de médicine, Université Paris-Saclay, 94270 Le Kremlin Bicêtre, France
[nn]UVSQ, Inserm, CESP, Université Paris-Saclay, 94807 Villejuif, France
[oo]Service de Gynécologie Obstétrique et Médecine de la Reproduction, Hôpital Foch, 40 rue Worth 92 150 Suresnes, France
[pp]Service de Médecine de la Reproduction et Préservation de la Fertilité, Polyclinique de Navarre, 8, boulevard Hauterive, 64000 Pau, France
[qq]Department of Reproduction and Gynecological Endocrinology, Medical University of Bialystok, Bialystok, Poland
[rr]Department of Clinical Genetics, Helsinki University Hospital, University of Helsinki, Helsinki, Finland
[ss]Service de gynécologie médicale, orthogénie et sexologie, Centre Hospitalier Universitaire de Lille, Université de Lille, 59000 Lille, France

eBioMedicine 2022;84: 104246
Published online 10 September 2022
https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104246

Summary

Background Primary Ovarian Insufficiency (POI), a public health problem, affects 1-3.7% of women under 40 yielding infertility and a shorter lifespan. Most causes are unknown. Recently, genetic causes were identified, mostly in single families. We studied an unprecedented large cohort of POI to unravel its molecular pathophysiology.

Methods 375 patients with 70 families were studied using targeted (88 genes) or whole exome sequencing with pathogenic/likely-pathogenic variant selection. Mitomycin-induced chromosome breakages were studied in patients' lymphocytes if necessary.

Findings A high-yield of 29.3% supports a clinical genetic diagnosis of POI. In addition, we found strong evidence of pathogenicity for nine genes not previously related to a Mendelian phenotype or POI: *ELAVL2*, *NLRP11*, *CENPE*, *SPATA33*, *CCDC150*, *CCDC185*, including DNA repair genes: *C17orf53(HROB)*, *HELQ*, *SWI5* yielding high chromosomal fragility. We confirmed the causal role of *BRCA2*, *FANCM*, *BNC1*, *ERCC6*, *MSH4*, *BMPR1A*, *BMPR1B*, *BMPR2*, *ESR2*, *CAV1*, *SPIDR*, *RCBTB1 and ATG7* previously reported in isolated patients/families. In 8.5% of cases, POI is the only symptom of a multi-organ genetic disease. New pathways were identified: NF-kB, post-translational regulation, and mitophagy (mitochondrial autophagy), providing future therapeutic targets. Three new genes have been shown to affect the age of natural menopause supporting a genetic link.

Interpretation We have developed high-performance genetic diagnostic of POI, dissecting the molecular pathogenesis of POI and enabling personalized medicine to i) prevent/cure comorbidities for tumour/cancer susceptibility genes that could affect life-expectancy (37.4% of cases), or for genetically-revealed syndromic POI (8.5% of cases), ii) predict residual ovarian reserve (60.5% of cases). Genetic diagnosis could help to identify patients who may benefit from the promising in vitro activation-IVA technique in the near future, greatly improving its success in treating infertility.

Funding Université Paris Saclay, Agence Nationale de Biomédecine.

Copyright © 2022 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Keywords: Primary ovarian insufficiency; Personalized medicine; NF-KB; Post - translational regulation; Meiosis/DNA repair genes; Mitophagy

Research in context

Evidence before this study

Infertility is a major public health problem, affecting 10% of couples worldwide. Primary Ovarian Insufficiency (POI) is one of the most common syndromes implicated in female infertility, affecting ~1-3.7% of women under 40 years. POI most often leads to permanent sterility and severe complications: osteoporosis, cardiovascular disease and even neurologic degenerative diseases. Remarkably, a decrease in longevity was also observed which could be due to specific causes. But most causes are currently unknown. Despite the technological leap in genetics, the clinical impact on the diagnosis and management of POI remains unknown, as well as the molecular mechanisms disturbed in POI.

Added value of this study

To get insight into this disorder, we studied the feasibility of a first line genetic diagnosis in a large cohort of 375 patients including 70 families and looked for new responsible genes and altered signalling pathways. We have sequenced either the whole coding part of the genome or 88 known causing genes. A high-yield diagnosis of 29.3 % was obtained supporting the use of genetics routinely to diagnose all unexplained POI. Interestingly, we identified 9 genes not previously related to POI or Mendelian disease and confirm 13 others previously reported in isolated patients or families. We showed how the molecular dissection of the pathways involved leads to personalized management of patients.

The main family is the DNA repair/meiosis/mitosis gene family (37.4% of cases), but it is also a tumour/cancer susceptibility gene family. Lifelong monitoring is therefore necessary to prevent or treat the appearance of these tumours. The second major family involved is that of follicular growth genes (35.4%). Strikingly, in 8.5% of cases, POI is the only single visible expression of a complex multi-organ genetic disease. A full patient assessment is required.

Other novel pathways identified could yield novel therapeutic targets: i.e. immunity, gene regulation, mitochondrial autophagy.

Three genes had been implicated in the large variance in the age of natural menopause, confirming a genetic link and a continuum between the two conditions, the difference may be related to the severity of the genetic variants involved, major in POI.

Implications of all the available evidence

We describe here a high-performance genetic diagnosis of POI, critical to understand the pathogenesis of POI and leading to personalized medicine. These results have major implications for preventing/curing comorbidities related to tumour/cancer susceptibility genes that could affect lifespan or multi-organ disease revealed by genetics. Apart from the infertility of patients, it is therefore their entire state of health that must be assessed and treated as soon as the patient consults for POI. This should be done according to the underlying cause which must imperatively be identified beforehand.

Genetics is also critical to establish a fertility prognosis for the promising technique of in vitro follicular activation in the future by predicting a residual ovarian reserve (60.5% of cases). The selection of patients who could benefit from this technique, the genetic cause highlighting existing follicles in the ovaries blocked in their growth, could clearly improve its success in the treatment of infertility of POI. The pathways identified could also provide future therapeutic targets.

Introduction

Infertility affects 15% of couples worldwide and is a public health problem. Primary Ovarian Insufficiency (POI) affects ~1-3.7% of the women before 40 years[1,2] with cessation of ovarian functions.[1] About 60–70% of cases remain idiopathic.[1] Women with POI are usually definitively infertile but spontaneous pregnancies have been described in 3.5% of patients with secondary amenorrhea or spaniomenorhea.[3] Moreover, various epidemiological studies have shown a decreased lifespan or an increased risk of all-cause mortality in infertile women.[4,5] It is thus a priority to identify the causes involved. Next generation sequencing (NGS) especially whole exome sequencing (WES) has recently identified several genetic causes of POI, although in single or rare families, mostly consanguineous.[1] Due to this high genetic heterogeneity, the clinical impact of the etiological diagnosis of POI remains unknown. In clinical practice, only karyotype and FMR1 studies are routinely performed with respective diagnosis yields of 7–10% and 3–5%.[1]

In this study, we describe the genetic landscape of POI in a large cohort of 375 patients, using WES or targeted NGS comprising all human POI genes known to date, and with a classification of variants using the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) criteria.[6] Our study revealed that a powerful etiological diagnosis is possible in a high proportion of patients, namely: 29.3%. We show here that

personalized genetic counselling and management of patients and family is possible based on the identification of the genetic cause. Our study also highlights genes not previously related to Mendelian phenotype, pathways and mechanisms in POI, potentially allowing identification of new therapeutic targets.

Methods

Ethics statement

The study was approved by all the institutions involved and by the Agence de Biomedecine (reference number PFS12-002). Written informed consent was received from participants prior to inclusion in the study.

Patients

Between 2017 and 2022, 375 patients were referred to our university hospital laboratory by different hospitals in Europe, Turkey, Africa, and Asia. We performed NGS analysis in patients who lacked the FMR1 premutation and had a normal karyotype. POI was diagnosed in the presence of primary amenorreha (PA), secondary amenorrhea (SA) or spaniomenorrhea (SP) for more than 4 months associated with follicle-stimulating hormone (FSH) plasma level $\geq$ 25 IU/L before the age of 40 years. Patients with known etiology of POI, such as chemotherapy, radiotherapy, or extensive ovarian surgery, were excluded from the study. The following clinical data were requested before the NGS analysis: menstrual cycle (PA, SA, SP), pubertal development, ethnicity, spontaneous pregnancies or pregnancies after in vitro fertilization (IVF), and familial history. Information on autoimmune disease or the presence of extraovarian symptoms—such as intellectual disability, hyperandrogenism, neurological and ophthalmic disorders, deafness, tumour/cancer, in the patient and/or family, family history of male or female infertility, was also requested. We also requested ultrasonography to assess ovarian and follicular sizes, the number of follicles, as well as a complete hormonal assay in particular the serum level of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol, anti-Mullerian Hormone (AMH), thyroid stimulating hormone (TSH), and autoantibodies (anti-TPO, anti-TG, and anti-21-hydroxylase antibodies).

Molecular genetics studies

a) A custom-made targeted NGS including all known genes (88) involved in POI to date (supplementary material and methods and Table S1)[7,8] was performed. WES was performed by IntegraGen SA (Evry, France) in case of consanguineous or familial cases (See supplementary material and methods).[7-9] We only considered variants classified as pathogenic or likely pathogenic according to ACMG guidelines.[6] Genes of unknown significance not previously related to Mendelian phenotype and identified in this study have been prioritized using *in silico* prediction softwares, ovarian expression, segregation studies, animal models, and interactions with other known genes causing POI.

b) Copy Number Variation (CNV) were studied using two methods:
   - For patients studied with WES, we used the Bioconductor DNACopy package (DNAcopy 1.32.0) and compared control exome data to reference samples pool (DOI: 10.18129/B9.bioc.DNAcopy). It implements the circular binary segmentation (CBS) algorithm to segment DNA copy number data. All changes were annotated with the catalog of the Database of Genomic Variants (DGV) to provide a comprehensive summary of structural variation in the Human genome.
   - For patients studied with targeted NGS, we used an in-house coverage-based pipeline to detect CNV.[10] This method is based on the Read Depth (RD) or the Read Count (RC), which reflects the abundance of the genome segment. RD is defined as the number of reads covering a given position in the sequence and RC is defined as the number of reads in a given region. Using these concepts and hypothesizing that the RD or RC is proportional to the initial abundance of the genetic material used for sequencing, we can detect potential CNV.

Chromosomal analysis

Hypersensitivity to the chromosome-breaking effect of crosslinking agents is a reliable marker of homologous recombination (HR) efficiency.[11] For POI genes involved in DNA repair and not expressed exclusively in germ cells, chromosomal breakage studies were performed in cultures of peripheral lymphocytes obtained from the patient, the mother when available, and a healthy woman as a control. The experiments were performed at the Gustave Roussy Institute (Villejuif, France), following a standard in-house protocol.[7 9,12] Fresh peripheral blood lymphocytes were cultured under standard conditions for karyotyping. DNA damage was induced by treating the cells with mitomycin C (MMC; Sigma) for 48 h to examine cellular hypersensitivity to DNA crosslinking agents. Three treatment conditions were used: without MMC to analyze spontaneous DNA damage and with 150 or 300 nM MMC as recommended.[11] Chromosome breaks were scored by an experienced cytogeneticist using at least 20 metaphases.

Role of the funding source

The study funders had no role in the study design of this study, data collection, data analysis, data interpretation, or report writing.

Results

Cohort characteristics

The characteristics of the patients recruited in this study are summarized in Figure 1, Figure S1, and Table S2. The cohort of POI comprises 375 patients (344 index patients and 31 affected mothers or sisters): 26.7% were familial and 73.3% were sporadic, 24.8% of patients had PA, 65.3% SA, and 9.9% SP. Targeted NGS was performed in 345 patients and WES in 30 patients. Twelve patients (12/375; 3.2%) had syndromic POI with additional extra-ovarian features (Figure S1, Table S3).

Molecular findings

In our whole cohort, we identified 216 variants in 215 patients (out of 375) (Figure 2, Tables S4-S7). In fourteen patients, we found strong evidence of pathogenicity for nine genes not previously related to Mendelian phenotype or POI (Table 1). Using the ACMG criteria for genes known to be implicated in POI, pathogenic (PV) or likely pathogenic (LPV) were identified in 110 patients. The diagnostic performance of our NGS study with the ACMG criteria[6] including only PV/LPV was 29.3% (110/375) for the whole cohort and 26.3% (61/232) for European patients (n = 232, 61.9% of the cohort) (Table S4). For isolated POI it was 28.4% (103/363 patients), and 58.3% for syndromic POI (7/12) (Table S3).

The diagnostic yield of targeted NGS is 28.7% (99/345) in the whole cohort, and 25.8% (57/221) in the European population. The diagnostic yield of WES is 36.7 % (11/30) in the whole cohort and 36.4% (4/11) in the European population.

Most genes (n = 24) were identified in single patients. Only nine genes were found in two different patients/families and seventeen "recurrent" genes were found in at least three patients/families (Figure S2) confirming the high genetic heterogeneity in POI.

In 25 other patients (25/375: 6.7%), only heterozygous PV/LPV were found in known autosomal recessive POI genes (Figure 2). This may either indicate a new mode of inheritance for these variants (as for *BMP15* or *FOXL2* known to have both autosomal dominant and recessive inheritance[7]), or most likely correspond to a carrier status (Table S7).

The genes displaying PV/LPV are involved in different pathways (Figure 2). Remarkably, 37.4 % of genes are involved in meiosis/DNA repair or mitosis making this family the major family involved in POI, 35.4% are involved in follicular growth, 19% in metabolism and mitochondrial functions, Ovarian development (6.1%), NF-kB pathway (1.4%), Autophagy (0.7%). (Figure 2).

We detected a CNV in a patient with POI and primary amenorrhea (ID 6). It was a 3.2kb-heterozygous deletion encompassing exons 10-17 of *STAG3* (Figure S3). The patient carried a heterozygous pathogenic variant of *STAG3*: NM_012447.4:c.3046delT:p.Ser1016-ProfsTer16. Parental samples were not available to perform segregation studies. We thus considered this patient as a presumed compound heterozygous.

For all other patients, especially those identified as carriers in our study, carrying a pathogenic or likely

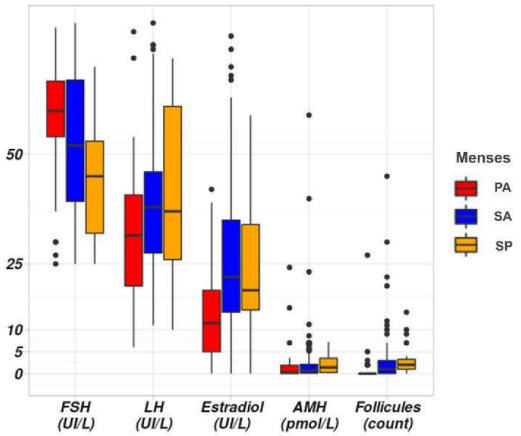


Figure 1. Hormonal and ultrasonographical datas in our cohort of patients with POI. Hormonal assays (FSH, LH, Estradiol and AMH) in patients according to menses. PA: Primary Amenorrhea, SA: Secondary Amenorrhea, SP: Spaniomenorrhea. The Y scale unit is variable according to each hormonal assay represented in the X-axis. Normal range: AMH (7-20.7 pmol/l); Respectively follicular, ovulatory, luteal phases and menopause: FSH (IU/L): (2.9-12), (6.3-24), (1.5-7), (17-95); LH: (IU/L) (1.5-8), (9.6-80), (0.2-6.5), (8-33); E2 (ng/l): (19.5-144.2),(63.9-356.7),(55.8-214.2),(≤ 32.2).

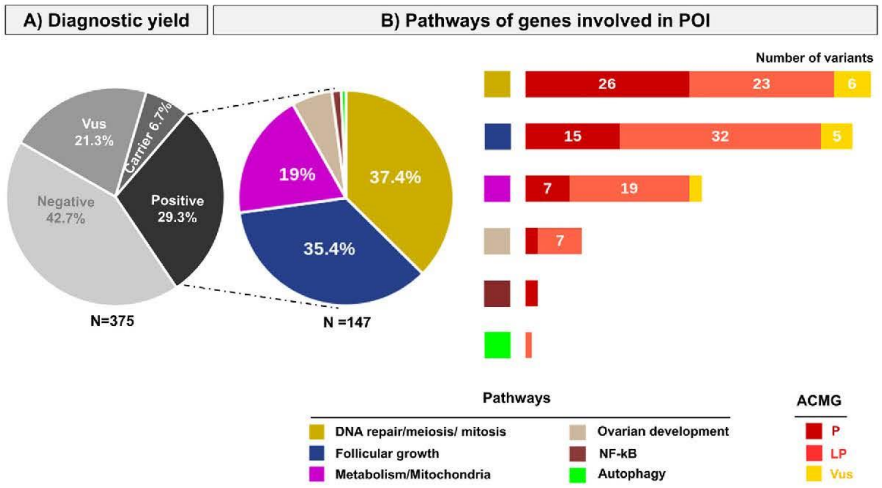


Figure 2. Genetic studies of the cohort of patients with POI. Patients were studied by a custom-made targeted NGS comprising 88 genes or by whole exome sequencing (see methods). **A) Diagnostic yield using ACMG criteria:** Variants are classified according to the American College of Medical Genetics (ACMG) guidelines. N= 375: the whole cohort comprises 375 patients with POI. Vus: Variant of unknown significance. Carrier: patients harbouring a heterozygous pathogenic variant in a known autosomal recessive POI gene. Positive: the diagnostic yield corresponds to patients carrying pathogenic (P) or likely pathogenic (LP) variants and is 29.3%. **B) Pathways of genes involved in POI.** The different pathways are indicated with different colors. The pie chart represents the proportion of patients with P or LP variants in a specific pathway: DNA repair meiosis and mitosis (37.4%), Follicular growth (35.4%), Mitochondria and Metabolism (19%), Ovarian development (6.1%), NF-kB (1.4%), Autophagy (0.7%). The histograms show the number and type of variants detected in each pathway.

pathogenic heterozygous variant in known autosomal recessive POI genes (n=19,) no CNV was detected.

I. Identification of genes and pathways not previously related to Mendelian phenotype or POI. Twelve candidate genes were identified in our cohort. Nine candidate genes are not previously related to a Mendelian phenotype or POI. For *XPNPEP2*, there is to date only a balanced translocation (X; 12) presumed to interrupt this gene that has been described in a POI patient and her affected mother.[13] The variants are mentioned in Table 1 and the family pedigrees are shown in Figure 3. We previously reported two genes, *FANCM* and *BRCA2*, involved in the RAD51 pathway causing non-syndromic POI.[9,12]

a) NF-kB signalling and regulation of inflammatory responses. ***NLRP11:*** In a Tunisian patient with POI and SP at the age of 20 years, we identified two compound heterozygous variants of *NLRP11* encoding the Nod-like-receptor protein (NLRP)11: a nonsense substitution in exon 6 (NM_145007.4: c.1867A>T), introducing a stop codon (p.Arg623Ter) and a missense substitution in exon 8 (NM_145007.4: c.2206G>A: p.Glu736Lys). The NLRP protein family regulates the immune response to infection through NF-kB and type I interferon signalling pathways.[14] NLRP11 is highly expressed in the testes and ovary as are many other NLRP proteins.[14] Remarkably, NLRP5 has been involved in POI in human and mice.[15] Moreover, a very recent study based on mouse models highlights the important role of inactivated NF−KB in POI.[16]

b) RNA binding protein and posttranscriptional/ translational regulations.

ELAVL2: In a Polish family, two sisters developed POI with SA at 20 and 24 years. WES revealed compound heterozygous variants in the RNA binding domain of *ELAVL2* (NM_001351472.2): c.448C>T, Arg150Cys and c.313C>T, Leu105Phe, the latter transmitted by the mother. *ELAVL2* encodes a RNA binding protein, mainly expressed in ovaries, testes and neurons. It is involved in post-transcriptional and post-translational regulations.[17] Mice deficient in *Elavl2* are sterile and ovaries are devoid of follicle.[17]

c) Meiosis/ DNA repair genes/ mitosis.

C17orf53 (HROB): In two sisters from a consanguineous Turkish family, both presenting PA and streak gonads,

ID	Ethnicity	Age	Menses	Gene	variant	Status	Pathway	Expression	Animal or in vivo models
258	Turkish	15	SA	**C18orf53 (HROB)**	NM_024032.5: c.502delG:p.Glu168ArgfsTer35	Hom	DNA repair & Meiosis	Ubiquitous	C18orf53-/- mice are infertile[18]
311	Turkish	16	PA						
310	North-African	24	SA	**HELQ**	NM_133636.5 : c.3095delA: p.Tyr1032SerfsTer4	Hom	DNA repair & Meiosis	Ubiquitous	Helq-/- mice are infertile[19]
373	North-African	20	SA						
317	North-African	16	PA	**SWI5**	NM_001318092.1 : c.261-1G>C:p.?	Hom	DNA repair & Meiosis	Ubiquitous	Impaired meiosis in in yeast[20]
302	Asian	29	SA	**CENPE**	NM_001813.2 : c.2023C>T:Q675Ter	Het	Cell Cycle	Ubiquitous	Embryonic lethality of Cenpe-/- mice[23]
303	Asian	14	SA						
304	Asian	34	SA						
311	North-African	16	PA	**SPATA33**	NM_153025.2: c.34dupT:p.Cys12LeufsTer2	Hom	Autophagy	Gonadal	Spata33 knockout suppresses mitophagy in germ cells[24]
270	North-African	20	SP	**NLRP11**	NM_145007.4: c.1867A>T : p.Arg623Ter/ c.2206G>A:p.E736K	Comp Het	Immunity-Inflammation	Ubiquitous	Reduced fertility in Nrlp11/-mice[16]
306	North-African	15	SA	**CCDC150**	NM_001080539.2 :c.291_292delTG :p.Cys97Ter	Hom	Unkown	Gonadal	No available animal model
314	Turkish	17	SA	**CCDC185**	NM_152610.3: c.1174C>T :p.Gln392Ter	Hom	Unkown	Gonadal	No available animal model
318	European	20	SA	**ELAVL2**	NM_001351472.2:c.448C>T / :p. Arg150Cys / c.313C>T :Leu105Phe	Comp Het	Post-transcriptional regulation	Gonadal & neurons	Female Elavl2-/- mice are infertile devoid of follicles[17]
319		24	SA						

***Table 1*: Variants in genes not previously related to Mendelian phenotype or POI.**
PA: Primary amenorrhea; SA: secondary amenorrhea; Hom: homozygous; Het : heterozygous; Comp Het : compound heterozygous.

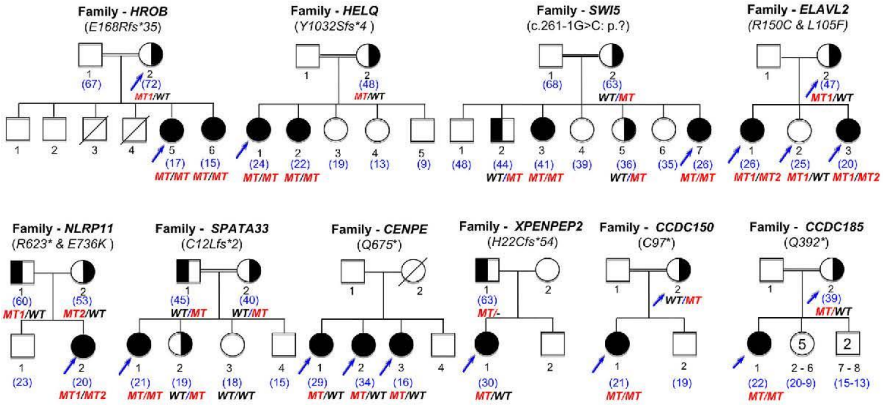


Figure 3. Pedigrees of the families with genes not previously involved in Mendelian phenotype or POI. On top of each family, the name of the gene is indicated, with the variant found. Double lines indicate consanguineous unions. The age of the patient at diagnosis is indicated in blue between brackets. Blue arrows indicate the patients and relatives studied with NGS (see text and Methods chapter). All family members available were studied by Sanger Sequencing. The segregation of the variants is shown under each individual sequenced. MT: mutated. MT1: first mutation. MT2: second mutation. WT: wild type. Family CCDC185: the number inside each symbol indicates the number of siblings in the family, either sisters (5) or brothers (2).

we identified a homozygous truncated variant of *HROB* (NM_024032.5: c.502delG; p.Glu168ArgfsTer35), found also homozygous in her affected sister and heterozygous in both parents. *HROB (C17orf53)* encodes a newly identified protein involved in homologous recombination (HR).[18] It corresponds to a factor containing an oligonucleotide/oligosaccharide (OB) fold that recruits MCM8 and MCM9—two proteins that, when defective, cause POI—to the site of DNA damage. Mice deficient in *Hrob* are infertile with small uteri and ovaries completely devoid of follicle.[18] Chromosome breakage studies revealed high chromosomal instability with spontaneous breaks, enhanced in the presence of mitomycin (MMC), and numerous radial figures, similar to what is observed in patients with Fanconi Anemia (FA) strongly supporting a defect in HR (Figure 4, Table S8).

HELQ: A patient born to consanguineous Moroccan parents presented SA at the age of 20 years. WES identified a homozygous truncated variant in exon 17 of *HELQ* (NM_133636.5: c.3095delA; p.Tyr1032SerfsTer4), heterozygous in her mother, who still had regular menses at the age of 50 years and homozygous in her affected sister. *HELQ* encodes a DNA helicase that plays a pivotal role in DNA replication, recombination and inter-strand crosslink repair.[19] *HELQ* deficient mice exhibit subfertility and tumour predisposition.[19] The orthologues of this protein in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* are required for meiotic double-strand break repair.[19] Concordantly, chromosomal studies in the patient revealed spontaneous chromosomal breaks markedly enhanced with MMC (Figure 4, Table S8).

SWI5: The proposita (25 years) and her sister (41 years), born to consanguineous Moroccan parents, had POI with PA and streak ovaries devoid of follicles. The mother had menopause at the age of 52 years. WES in the proposita identified a homozygous splice variant in the canonical GT acceptor splice site of intron 3 of *SWI5* (NM_001318092.1: c.261-1G>C), also homozygous in the affected sister and heterozygous in unaffected siblings and parents. This variant is absent in all available databases. *In silico* predictions with all available softwares (Human Splice Finder, dbscSNV, Alamut and SpliceAI) of the splice variant predicts a high impact on splicing. *SWI5* encodes a protein part of an auxiliary complex, Swi5-Sfr1 that regulates HR through the RAD51 pathway, synergistically with the HOP2-MND1 complex.[20] Interestingly, *PSMC3IP* (encoding HOP2) and *MND1* cause POI in humans.[1,21] Furthermore, an orthologue of SWI5-SFR1 in yeast (*Schizosaccharomyces pombe*)— *Sae3-Mei5*—is required for meiotic HR.[20] Concordantly, the patient's cells exhibit high MMC-induced chromosomal breaks (Figure 4, Table S8). All available studies on Swi5-Sfr1 have only been performed *in vitro* or in yeast, and so far, it is not known whether SWI5 plays a role in mammalian HR and meiosis.[20,22] The family we report here provides a unique opportunity to observe the *in vivo* effect of a high impact bi-allelic molecular defect of *SWI5*, confirming its functional importance in humans. The role of SWI5 in meiosis is consistent with the phenotype of both sisters in our family, with early POI and ovarian atrophy. SWI5 could also act in a complex with SFR1 in humans, since the interaction between the two molecules is predicted to be

A)

	Gene	Genotype	Aberrant metaphases			Breaks/ metaphase			Radial figures		
			Untreated	MMC (150 nM)	MMC (300 nM)	Untreated	MMC (150 nM)	MMC (300 nM)	Untreated	MMC (150 nM)	MMC (300 nM)
Control	WT	WT	0/50 (0%)	1/50 (2%)	1/50 (2%)	0	1/50 (0,02)	7/50 (0,14)	0/50 (0%)	0/50 (0%)	0/50 (0%)
Patient 1	HELQ	Hom	3/50 (6%)	23/50 (46%)	41/50 (82%)	4/50 (0,08)	64/50 (1,28)	199/50 (3,98)	1/50 (2%)	8/50 (16%)	26/50 (52%)
Patient 2	HROB	Hom	5/50 (10%)	43/50 (86%)	19/19 (100%)	6/50 (0,12)	190/50 (3,8)	309/19 (16,26)	0/50 (0%)	numerous	extremely numerous
Patient 3	SWI5	Hom	0/50 (0%)	19/50 (38%)	45/50 (90%)	0	40/50 (0,8)	450/50 (9)	0/50	4/50 (8%)	49/50 (98%)
Patient 4	Fanconi anemia	Hom	4/50 (8%)	48/50 (96%)	30/30 (100%)	4/50 (0,08)	437/50 (8,74)	>30	0/50 (0%)	numerous	extremely numerous

WT: wild type, Hom: Homozygous

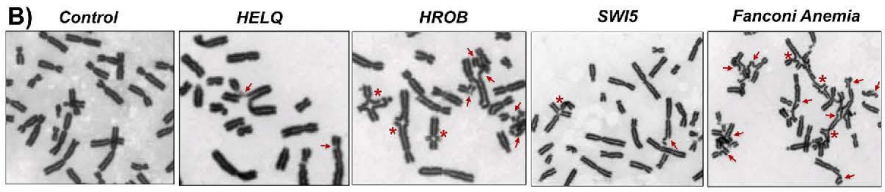


Figure 4. Chromosomal instability in patients with molecular defects of DNA repair genes. A). Chromosomal breaks analysis of the patient's lymphocytes, a control (a WT fertile woman), and a patient with Fanconi anemia, in the presence of increasing concentration of mitomycin (MMC). **B)** Selected figures of metaphases from the patients with molecular defects of SWI5, HELQ, HROB compared to Fanconi anemia and control cells in the presence of 300 nM of MMC. Chromosomal breaks are shown with red arrows and radial figures with asterisks.

In the absence of MMC, while no spontaneous breaks are observed in cells of the patient with the SWI5 homozygous splice variant, respectively 6% and 10 % of cells of the patients with homozygous truncated variants of HELQ and HROB presented increased breaks, similarly to cells of the patient with Fanconi anemia (8%). In the presence of 150nM MMC, 86% of cells with the HROB pathogenic variant presented breaks with 3.8 breaks per metaphase very similarly to cells of the patient with Fanconi anemia (96%) and radial figures were observed in numerous cells of both types. Increased breaks were also observed in 46% of cells with the HELQ pathogenic variant (1.28 breaks per metaphase) and 38% of cells with the homozygous SWI5 variant (0.8 breaks per metaphase). Radial figures were observed in 16 % and 8 % of cells respectively. At 300 nM MMC, HROB-cells mimic Fanconi anemia cells, all presenting breaks (16.26 breaks per metaphase) with numerous radial figures, while 90% of SWI5-cells presented breaks with a mean of 9 breaks per metaphase and 82% of HELQ-cells with a mean of 3.98 breaks per metaphase. HROB-cells mimic Fanconi anemia cells with spontaneous chromosomal instability and marked hypersensitivity to MMC while HELQ-cells and SWI5-cells have a milder phenotype, but clearly with increased breaks when compared to control cells, and with radial figures, a pathognomonic feature of Fanconi anemia.

abolished in our patients. Our results thus reinforce the crucial role of the Swi5-Sfr1 complex in meiosis and provide a strong argument for extending its role to the human species.

***CENPE*:** This study includes a family with mixed origin (Asian and European) in which three sisters presented POI with SA at 16, 29 and 34 years. WES identified a heterozygous, stop-gain variant of *CENPE* (NM_001813.2: c.2023C>T; Q675Ter). *CENPE* encodes the centromeric protein E, a kinesin-like motor protein essential for correct chromosome segregation in both meiosis and mitosis and in genome stability. It is highly expressed in germ cells. In mice this protein has an essential role in meiosis and in maturing oocytes.[23]

d) Mitochondrial autophagy (Mitophagy).

***SPATA33*:** In a patient with POI and PA born to consanguineous Algerian parents, WES studies identified a homozygous insertion of a single nucleotide in the exon 1 of *SPATA33* (NM_153025.2: c.34dup; p.Cys12LeufsTer2), heterozygous in her parents and one unaffected sister. The other unaffected sister inherited both wild-type alleles. SPATA33 is a protein exclusively expressed in mitochondria germ cells.[24] Recent *in vitro* studies performed on mouse testes revealed that this protein is localized in mitochondria and has been described as a novel autophagy mediator for mitophagy. This suggests a potential role of mitophagy in POI (mitochondrial autophagy).[24]

e) Gene involved in peptide processing.

***XPNPEP2*:** In a French patient presented POI and SA at the age of 30 years, we identified a paternal heterozygous frameshift deletion in exon 2 of *XPNPEP2* (NM_003399: c.63_94del; p.His22CysfsTer54). *XPNPEP2* encodes APP2, an aminopeptidase, ubiquitously expressed that removes N-terminal amino-acids

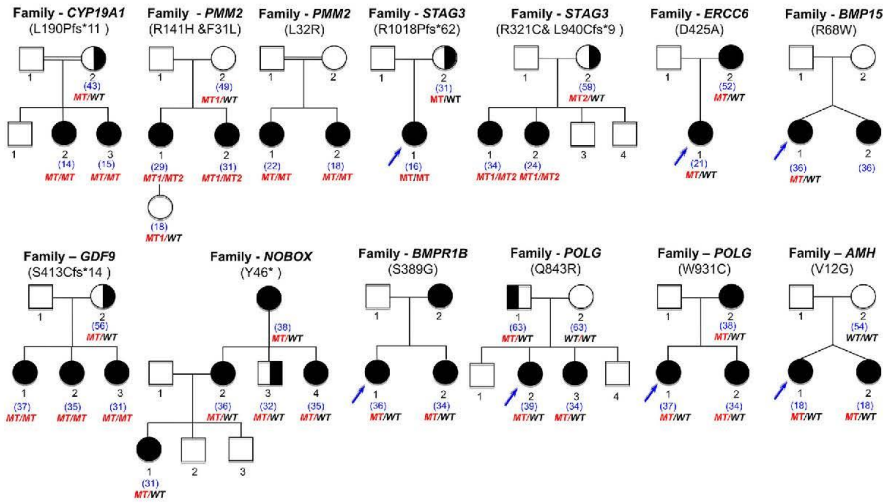


Figure 5. Pedigrees of the family confirming the causal role of genes in POI. Double lines indicate consanguineous union. Blue arrows indicate the patients and relatives studied with NGS, The other family members available are studied by Sanger sequencing. The segregation of the variant is shown under each sequenced individual. MT: Mutated, MT1: first mutation, MT2, second mutation, WT: wild type. The age of patients at diagnosis is indicated in blue between brackets.

from peptides with a penultimate prolyl residue (as Arg-Pro-Pro)[25] notably collagen that regulate follicle growth.[25] In the rat ovary, it was suggested that XPNPEP2 regulates collagens formation.[25] To date, there is only a single report of a balanced translocation (X;12) that interrupts *XPNPEP2* in a patient and her mother, who both presented with SA and POI.[13] This point PV of this gene that we identified here validates its causal role in POI.

f) Genes with unknown function. Interestingly two genes belonging to the coiled-coil family with unknown function were identified in two unrelated patients.

***CCDC150*:** In a consanguineous Moroccan patient with primo-secondary amenorrhea at the age of 15 years, WES identified a homozygous two-base-pairs deletion in exon 2 of *CCDC150* (containing 28 exons): NM_001080539.2: c.291_292delTG: p.Cys97Ter. This gene is highly expressed in the testes, according to the GTex database. Of note, only adult ovaries are included in GTex. Other genes exclusively expressed in testes according to GTex were in fact also expressed in foetal ovaries such as *STAG3*.[1] Very little is known about this protein. However, a strong interaction is predicted between CCDC150 and RAD50, a major protein involved in homologous recombination, using String software (https://string-db.org/).

***CCDC185* (*C1orf65*):** A Turkish patient born to consanguineous parents had POI and early SA at the age of 17 years. WES identified a homozygous stop codon in the unique exon of *CCDC185* (NM_152610.3: c.1174C>T: p.Gln392Ter), heterozygous in the mother. This gene is exclusively expressed in the testes according to the GTex database.

II. Involvement of genes responsible for syndromic POI in patients with apparently isolated forms. Unexpectedly, in 32 (8.5%) patients initially presenting as isolated POI, we identified PV/LPV in genes known to cause syndromic POI (Table S7, S9). One patient with POI and early SA had the G188Q homozygous PV of *GALT*, the most frequent mutation causing galactosemia.[26] It is a severe, life-threatening metabolic disease often diagnosed at birth and fatal without specific regimen. Enzymatic assays confirmed the diagnosis. Reverse phenotyping revealed only a cataract during infancy treated by surgery. Our patient survived to adulthood without any specific medical care unlike all previously reported adult patients with an early childhood diagnosis who had a continuous adapted regimen. Eight patients inherited genetic defects in genes causing pulmonary arterial hypertension (PAH): *CAV1(n=1)*, *BMPR2 (n=2)* or *BMPR1B (n=5)*.[27] *BMPR2* and *BMPR1B* encode a transmembrane receptor, member of the bone morphogenetic protein (BMP) receptor family and *CAV1* encodes caveolin that has a crucial role in signal transduction and vesicular trafficking.[27 29] All these proteins are expressed both in lungs and ovaries especially in granulosa cells and display functional roles in both tissues.[1,27,28] Deficient bmp15-/- mice are subfertile with decreased ovulation and fertilization rates while gdf9-/-

mice are sterile.[28] *Cav1-/-* null mice show reduced fertility.[29] The absence of PAH in particular in patients with variants of *BMRP2* may be explained by several mechanisms: i) the type of the variant; indeed, 50 to 75 % of the *BMPR2* variants detected in patients presenting PAH were truncated variants while in POI only missense variants are found[30,31]; ii) the localization of the variant: the majority of the BMPR2 variants detected in patients with PAH are located in the kinase domain of the protein (encoded by exon 6-10)[30] while three out of the four BMPR2 variants detected in POI patients are localized in the cytoplasmic tail of BMPR2 (the L656S and R597Q variants described here and the previously reported S987F variant).[32] It was reported that patients carrying a mutation affecting the cytoplasmic tail of BMPR2 were characterized by an older age at diagnosis compared with other BMPR2 mutation carriers[33] and iii) the low penetrance of the mutation observed for PAH genes in particular for *BMPR2*.[27,31] The penetrance of *BMPR2* mutation is estimated to be between 20 and 43%.[27,31] A 20-year-old patient had a LPV in *BMPR1A*. This gene predisposes to hamartomatous polyposis, absent in our patient. Seven patients had genetic defects in *POLG* encoding the mitochondrial DNA polymerase, without associated neurological or ocular symptoms. We report four supplementary variants of *TP63* (one splice variant and three missense variants), a gene causing both isolated and syndromic POI with dominant inheritance.[34] TP63 variants described in POI are usually located in the C-terminal region.[34] However, missense and truncated variants in the different domains of TP63 causing POI have been described.[35] Our data confirm that pathogenic or likely pathogenic variants in both the 5' end (c.192+2T>G) of TP63 or in the N-terminal (p.Ile225Thr, p.Lys214-Glu) or the C-terminal (p.Thr566Met) regions of TP63 cause POI. One patient had a heterozygous LPV of TWNK, a mitochondrial helicase implicated in progressive external ophtalmoplegia with both dominant and recessive mode of inheritance.[36] In all these cases, a comprehensive evaluation of patients and their families was recommended with appropriate follow-up in a multidisciplinary team.

III. Confirmation of the causal role of genes in POI. In 26 patients, we identified PV/LPV in thirteen POI genes previously described in single patients/families (Figure 5, Table 2). This confirmed their role in the pathogenesis of POI worldwide. We showed recently that a patient harbouring a homozygous *SPIDR* truncating variant exhibited a strong MMC-induced chromosomal fragility. This supported a role of SPIDR in the RAD51 pathway and HR.[8]

IV. Syndromic POI

. - Known syndromic Genes identified

In our cohort, 12 patients (12/375 =3.2%) had syndromic POI (Table S3). We identified the genes involved in seven patients (7/12; 58.3%). In all these cases, genetic diagnosis led to a complete screening for other signs potentially associated with each syndrome, and to familial segregation studies.

- Possible syndromic POI not previously described

Interestingly, our series included four patients with new syndromic phenotypes indicating previously unreported syndromes (Table S3). They include: 1) keratoconus, 2) horseshoe kidney and epilepsy, 3) Marfanoid habitus, scoliosis and hyperlaxity and 4) single kidney, Hashimoto's thyroiditis, ptosis, and scoliosis. Genes causing these syndromic POI phenotypes remain to be discovered.

V. Patients with variants in two different genes. In a small proportion of patients (8/375; 2.1%), we identified P/LPV in two different genes (Table S10). In these patients, however, one of the mutated genes alone was sufficient to cause POI. Therefore, we did not find evidence of di/multigenic inheritance of POI in our cohort. Moreover, each exome is known to contain at least hundreds of rare variants, and it is not surprising to find heterozygous pathogenic or likely pathogenic variants in more than one POI gene. A recent study based on 6,447 exomes of healthy, genetically unrelated Europeans of two distinct ancestries estimates that each individual is a carrier of at least two pathogenic variants in currently known autosomal recessive genes.[37]

Discussion

Pathways and candidate genes involved in POI not previously described in humans

Our study shows the powerful approach to identify genetic etiology and pathways not previously implicated in POI. This allows better understanding of the pathophysiology of POI and opens the way to the development of novel therapeutic targets.

The immune pathway has a major role in the ovary and may explain 4–31% of POI cases.[1] However, no specific gene has been found in isolated POI. AIRE causes the APECED syndrome (Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy).[1] We involve in this study *NLRP11* a gene of the immune NF-kB pathway in isolated POI not previously implicated. Environmental factor especially phthalates, bisphenol A, pesticides have a negative impact on ovarian function, yielding increased follicular depletion.[1] Interestingly, the NF-κB pathway is involved in the production of TNF-α and IL-6 in response to bisphenol A and may also be a therapeutic target.[38]

We also describe novel mechanisms in POI revealed by the genetic defect of *ELAVL2*, involving post-

ID	Ethnicity	Menses (age)	Gene	Variant	Status	ACMG	Pathway
321	North-African	PA	**BRCA2**	NM_000059.4:c.8350C>T :p.Arg2784Trp	Hom	P	DNA repair & Meiosis
167	European	SA (18)	**FANCM**	NM_020937.4:c.5101C>T :p.Gln1701Ter / c.1528G>A : p.Gly510Ser	Pres Comp Het	P/LP	DNA repair & Meiosis
			ATM	NM_000051.4:c.6596_6597delCT : p.Ser2199Ter	Het	P	DNA repair & Meiosis
192	Finnish	PA	**FANCM**	NM_020937.4:c.5101C>T :p.Gln1701Ter	Hom	P	DNA repair & Meiosis
305	Finnich	PA	**FANCM**	NM_020937.4:c.5101C>T :p.Gln1701Ter	Hom	P	DNA repair & Meiosis
306	Finnich	PA	**FANCM**	NM_020937.4:c.5101C>T :p.Gln1701Ter	Hom	P	DNA repair & Meiosis
326	European	SP (20)	**FANCM**	NM_020937.4:c.5101C>T :p.Gln1701Ter / c.575A>T : p.Gln192Leu	Comp Het	P/LP	DNA repair & Meiosis
323	European	SP (17)	**MSH4**	NM_002440.4:c.2198C>A : p.Ser733Ter	Hom	P	DNA repair & Meiosis
59	Asian	PA	**SPIDR**	NM_001080394.4: c.814C>T: p.Arg272Ter	Hom	LP	DNA repair & Meiosis
55	North-African	SA (39)	**BNC1**	NM_001717.4: c.2319C>A:p.Asn773Lys	Het	LP	DNA repair & Meiosis
88	European	SP (18)	**ERCC6**	NM_000124.4: c.1996C>T : p.Arg666Cys	Het	LP	DNA repair & Meiosis
109	European	SP (27)	**ERCC6**	NM_000124.4: c.1996C>T : p.Arg666Cys	Het	LP	DNA repair & Meiosis
79	European	SA (19)	**ERCC6**	NM_000124.4: c.1274A>C :p.Asp425Ala	Het	LP	DNA repair & Meiosis
105	European	SA (30)	**ERCC6**	NM_000124.4: c.1274A>C :p.Asp425Ala	Het	LP	DNA repair & Meiosis
211	Middle East	SA (37)	**ERCC6**	NM_000124.4: c.1274A>C :p.Asp425Ala	Het	LP	DNA repair & Meiosis
140	European	PA	**BMPR1A**	NM_004329.3: c.1327C>T : p.Arg443Cys	Het	LP	Follicular growth
155	European	SA (22)	**BMPR1B**	NM_001256793.2: c.761G>A : p.Arg254His	Het	LP	Follicular growth
156	European	SA (22)	**BMPR1B**	NM_001256793.2: c.761G>A : p.Arg254His	Het	LP	Follicular growth
267	North-African	SA (33)	**BMPR1B**	NM_001256793.2: c.1165A>G : p.Ser389Gly	Het	LP	Follicular growth
268	North-African	SA (35)	**BMPR1B**	NM_001256793: c.1165A>G:p.Ser389Gly	Het	LP	Follicular growth
			PCCB	NM_000532: c.646A>G:p.Met216Val	Het	LP	Metabolism
38	European	SA (16)	**BMPR1B**	NM_001256793.2 : c.836A>T:p.Gln279Leu	Het	LP	Follicular growth
163	European	SA (21)	**BMPR2**	NM_001204.7: c.1967T>C : p.Leu656Ser	Het	LP	Follicular growth
275	European	PA	**BMPR2**	NM_001204.7:c.1790G>A : p.Arg597Gln	Het	LP	Follicular growth
			AMH	NM_000479.5:c.35T>G :p.Val12Gly	Het	LP	Follicular growth
325	European	SP (24)	**ESR2**	NM_001437.2:c.335C>A :p.Ser112Ter	Het	LP	Follicular growth
112	Turkish	SA (14)	**CAV1**	NM_001172895.1: c.1A>G: p.Met1Val	Het	P	Follicular growth
272	European	PA	**RCBTB1**	NM_018191.4: c.1271T>G :p.Phe424Cys / c.962C>T : p.Pro321Leu	Pres Comp Het	LP/LP	Follicular growth
168	North-African	SA (31)	**ATG7**	NM_006395.3: c.1478A>G : p.Lys493Arg	Het	LP	Autophagy

***Table 2*: Variants confirming the causal role worldwide of genes reported in single patients/families.**
PA: Primary amenorrhea; SA: secondary amenorrhea; Hom: homozygous; Het: heterozygous; Comp Het: compound heterozygous; Pres Comp Het: Presumed compound heterozygous (parents not available); ACMG: Classification of variant according to American college of Medical genetic; P: Pathogenic, LP, Likely pathogenic. Patient 105 is the mother of patient 79; Patient 267 and 268 are sisters.

transcriptional and translational regulations in the ovaries, known to play a major physiological role.[39] *Elavl2-/-* mice are infertile. Interestingly, these two candidate genes (*ELAVL2* and *NLRP11*) have been recently associated with the age of natural menopause (ANM)[40] reinforcing the genetic link between POI and the physiological variance of the ANM (see further).

We found strong evidence of a causal role in POI for four DNA repair/meiosis/mitosis genes based on mice/yeast models, and/or chromosomal instability. A high chromosomal fragility was found in our patients with defects in three new DNA repair genes: *HROB*, *HELQ*, *SWI5*, the highest found for the homozygous truncation of *HROB*, similar to FA cells (Figure 3, Table S8). However, there was no sign of FA in our patients (anaemia, cancer microcephaly, small size or café-au-lait spots). This chromosomal fragility may lead to an increased risk of malignancies and therefore a long-term follow-up by a multidisciplinary team is indicated.

In our study, we only performed MMC-induced chromosome breakage studies in patients with possible genetic alteration of double-strand DNA repair genes like *HELQ*, *SWI5* and *HROB (C17orf53)*. Indeed, MMC-induced chromosomal breakage study only detects defects in homologous DNA repair and does not allow evaluating defects in other DNA repair pathways.[41] Thus, we suggest a combined two-step approach in POI patients using sequentially an NGS study followed by a chromosomal breakage study in patients with variants in a gene known or supposed to be involved in

homologous recombination. This can improve variant classification.

Interestingly, we identified other candidate genes, *CCDC155* and *CCDC185*, exclusively expressed in gonads but with unknown function. Mice models are needed to unravel unknown pathophysiological mechanisms involved in POI. *SPATA33* has been recently suggested to be involved in autophagy. If confirmed in rodent models, it would support the implication of this crucial pathway in human follicular physiology and provides a future perspective on curing autophagy-related reproductive infertility diseases as for other linked diseases.[42]

Performance of genetic diagnosis and impact on patients' management

Despite the large-scale use of NGS analysis in the era of genomic medicine, the study of genes involved in POI is often limited to the screening of the FMR1 premutation (3-5% of cases).[1] We show here in our large cohort of 375 patients that NGS is an effective diagnostic tool for patients with POI. Using ACMG criteria, the rate of detection of pathogenic variants was 29.3% in the whole cohort and 26.3% in the European population (232 patients) (Including only P/ LP variants in known POI-genes. Variants in genes not previously related to POI or a Mendelian phenotype are considered of unknown significance-VUS as recommended[6]). This high yield supports a thorough genetic study of all unexplained POI patients in clinical practice. Very few studies were previously reported including either a small cohort (20-60 patients), a very limited number of POI genes (n=18),[43 45] or reporting only heterozygous variants, the pathogenicity of which could not be formally demonstrated. Indeed no familial segregation studies were performed[46] and the rodent models deficient in these genes have a recessive mode of transmission.[46] Moreover, in these studies, authors also considered VUS or likely benign variants that cannot be used for a genetic diagnosis.[43 47] Only variants classified as pathogenic or likely pathogenic can guide management of patients. Accordingly, we could not confirm the high involvement described up to 6.2% for some POI genes notably *NOBOX* or *BMP15*.[43 45] Of note, the R117W-*NOBOX* variant is classified benign according to ACMG criteria and has a high Minor Allele Frequency-MAF up to 8.17 % in the African population in GnomAD exome and genome databases. Efforts to improve adherence to these guidelines will be important to prevent erroneous misclassification of non-pathogenic variants in POI genetic testing and inappropriate diagnosis.

To date, both homozygous and heterozygous variants of NOBOX have been reported in patients with POI, some of which have been validated with *in vitro* functional studies.[1,45,48 50] We report an additional truncating variant of NOBOX (Y46X) in two unrelated patients (ID 143 and 331) (Figure 5). Unlike previous reports, we were able to perform a large familial transmission study in three generations in one family (family of the proposita with ID 331). The patient's mother, grandmother and maternal aunt, all with POI and secondary amenorrhea, harboured the Y46X variant of *NOBOX*. This strongly supports an autosomal dominant transmission of this truncated variant. Altogether these data argue that inheritance pattern of NOBOX is either autosomal dominant[1] or autosomal recessive[49,50] with a genotype-phenotype correlation. Biallelic truncated variants of NOBOX cause POI and primary amenorrhea with a recessive mode of inheritance while heterozygous variants of NOBOX yield POI and secondary amenorrhea with an autosomal dominant transmission or haploinsufficiency.

The identification of the genetic cause has a major impact on genetic counselling and personalized patient care, with:

i) *Psychological consequences for patients and their family*: as it reveals the causal mechanism for their infertility. Furthermore, offering a presymptomatic genetic testing in siblings may enable fertility preservation, if appropriate.
ii) *Important information on the fertility prognosis by predicting a possible residual OR.* There is no direct method to evaluate this OR. AMH assays are negative when only small follicles are present in the ovaries.[1]

We show that in 60.5% of our patients the genetic defect allows prediction of a persistent OR at an early stage: this includes patients with defects in genes involved in follicular growth (35.4%), metabolism and mitochondrial functions (19%), ovarian developement (6.1%), autophagy (1 patient). Indeed, previous studies have reported positive AMH values and even pregnancies in patients with defects of these gene families, and the OR is also conserved in the corresponding rodent models.[1,51] It should be noted that, concordantly, previous histological study revealed the presence of an OR in 57% of patients with POI.[52]

For instance, we identified a mild form of galactosemia with a homozygous PV of *GALT* in a patient initially presenting with isolated POI. Such patients have 48% of chances of being spontaneously pregnant in two years[26] (90% in the general population). The patient stopped the oocyte donation program she had started. Other patients with complete *FSHR* or *BMP15* inactivation are known to have a preserved OR, although a rapid decrease can occur.[1,52,53] Similarly, patients with POI and mild mutations of some meiosis/DNA repair genes: *FANCM, ERCC6, BNC1* may have spontaneous pregnancies, as found in our cohort.[1,9] This may be due to a hypomorphic mutation or alternative compensatory pathways or to the fact that heterozygous mutations are

found with possible escape of oocytes to DNA damage. The genetic diagnosis of POI is thus a medical priority as soon as all other causes have been eliminated. Fertility preservation in a multidisciplinary team should be discussed without delay in these patients and their affected siblings when appropriate to avoid the rapid follicular atresia that may occur in such patients.[1,53] The prediction of a residual OR could allow these patients to benefit from new in vitro activation- IVA techniques in the near future.[54] Variable results were obtained in small cohorts of unselected POI with a yield of 3.7 up to 21% of healthy newborns.[54] A genetic pre-screening of patients could markedly improve the success of IVA by excluding patients whose ovarian reserve is predicted to be absent or severely impaired.

Similarily, in male infertility[55] it has been proposed that a genetic diagnosis could predict positive testicular sperm extraction (TESE) or, on the contrary, may avoid unnecessary surgical interventions in case of major defects of DNA repair and meiosis genes.[55]

By contrast, in 29.4% of our patients, often with PA, major defects in meiosis/DNA repair genes are found. A major alteration of the OR is predicted with a very poor fertility prognosis, as in previously reported patients.[1] This is also confirmed by the corresponding animal models.[51] A rapid referral of these patients to egg donation or adoption could avoid repeated IVF failures and unnecessary delay in their parental desire.

iii) *Prevention or treatment of possible comorbidities.* In our cohort, 45.9% of patients may have, or are at risk to develop, associated comorbidities, requiring a comprehensive assessment by a multidisciplinary team:

   α) Other organic defects are found in genetically revealed syndromic POI (8.5% of cases): in 32 patients initially referred as isolated POI, we identified pathogenic variants of genes causing syndromic POI. Similarly, Alhathal et al found that in 3.1% (9/275 patients presenting male infertility with azoospermia or severe oligozoospermia), infertility can be the sole or major phenotypic expression of genes that are known to cause multisystemic manifestations in humans.[56] In the same way, Kraucz et al found that 3/29 patients presenting infertility with Sertoli cell-only syndrome had biallelic variants of FANCA with only subtle haematological abnormalities corresponding in fact to occult FA.[57] The existence of potential defects of other organs, undiagnosed, requires complete evaluation of the patients and most often a long-term follow-up of patients and their families.

   β) Tumour/cancer in POI linked to meiosis/DNA repair genes (37.4% of cases):37.4% of patients had alteration of meiosis/DNA repair genes or mitosis. Although this gene family is the main contributor to POI, unexpectedly only six genes so far are known to cause POI and tumours/cancers in humans: *BRCA2, FANCM, MCM8/9, PSMC3IP,STAG3.*[1,7,9,12] The majority of the corresponding deficient mice, however, developed tumours.[51] Prospective studies in larger cohorts of patients will allow a more precise evaluation of the risk of tumours/cancers in these patients. Genetic counselling should be offered to patients and their families with long-term follow-up when adequate.

   The identification of this latter subpopulation of patients with POI due to PV/LPV variants in cancer susceptibility genes is therefore a medical and scientific priority.

Overlap between genes implicated in azoospermia and POI

There is a remarkable overlap between genes involved in azoospermia and POI.[56] It is interesting to note that genes belonging to the meiosis/DNA repair family including genes of the synaptonemal complex is the leading family shared by POI and male infertility with azoospermia. This is the case for novel variants in genes identified in our study: *STAG3,*[58 60] *SPIDR,*[8,56,61] *PSMC3IP,*[62,63] *HFM1,*[56,64] *FANCM.*[9,65] We can therefore expect the discovery of other genes causing both male and female infertility in the near future, belonging especially to the meiosis and DNA repair gene family.

Link between genes involved in POI and genes involved in the physiological reproductive lifespan

Epidemiological studies in various populations have evidenced a link between the age of natural menopause and lifespan or the odd ratio of all-cause mortality, including cancer.[1,4,5] WES and genome-wide association studies (GWAS) have highlighted a genetic link between POI and the ANM, through the DNA repair/meiosis gene family, the latter also being involved in aging.[4,5] Recently, a large GWAS study involving more than 200 000 women worldwide identified 290 loci involved in the ANM with an effect ranging from 3.5 weeks to 74 weeks (~1.2 years).[40] Very interestingly, three genes involved in POI in our study: *HELQ, ELAVL2* and *NLRP11* were also found to be associated with the ANM. This markedly supports the role of these candidate genes and pathways in the age of physiological and pathological menopause/POI, especially *ELAVL2* and *NLRP11.*

Conclusion

We describe here a highly successful genetic screening in a large cohort of patients with POI, allowing a genetic diagnosis in 29.3% of the patients. We showed that in 8.5% of cases, POI is the only phenotypic expression of

a complex genetic disorder affecting other organs. This led to an adapted genetic counselling and a personalized management of patients and families either for prevention/treatment of potential comorbidities (other organ defects, or tumours/cancers when DNA repair genes are involved) or for early fertility preservation when an OR can be predicted in the light of the future development of innovative treatments of IVA. Strong evidence involved 9 new genes in POI and, three previously undescribed pathways that may provide new therapeutic targets for the infertility of POI in the future. Identifying the causes of POI will greatly expand our knowledge of the mechanisms controlling fertility in women.

Limitations

This work involves the largest cohort of patients with POI studied by next generation sequencing to date. However, due to the relatively high prevalence of this condition (1 to 3.7% of women before the age of 40),[1,2] a larger cohort could be studied in the future to better define the monogenic part of POI, ~30 % as shown in this study. This will: i) confirm the proportion of POI that can benefit from genetic diagnosis, ii) definitively implicate the nine genes identified here as candidate genes in POI. Indeed, these genes had never been associated with POI or a Mendelian disease, iii) to study the impact of a genetic diagnosis on the management of patients. Our study could encourage physicians to systematically prescribe NGS studies to all patients without an identified etiology, and not be limited solely to karyotyping and screening for the FMR1 premutation, the only genetic studies currently performed in most centres across the world. The Guidelines of International Societies in the field of Reproduction and Fertility may be updated in the light of these results. It should be noted that in our study, the segregation of the identified variants could only be achieved in 40% of cases because the parents were not available for the other patients. The absence of available trios has hampered the assessment of *de novo* mutations that might explain a subset of POI as has been observed in infertile men[66] or other conditions[67] and may improve the diagnostic performance of NGS studies in POI.

Contributors

Conceptualization: MM, CO. Formal analysis: AH, MM, NA. Funding acquisition: MM.
Data Collection and Patient's Recruitments: AR, CO, SDC, IB, LBR, NF, CB, RR, KM, SL, MMa, ICD, AC, MP, BDH, SP, CD, CNB, HE, MK, CRL, MF, ELB, PL, EG,AZ, FA, FP, EBB, AB, LG, MBe, NG, SO, BGD, BI, LL, SH, AMGj, ABP, HF, MP, HL, SE, PBG, SW, SH, KA, SCJ. Resources: JP, CC. Clinical Investigation: AH, AMG, KA. Data Curation: AH, MBr, SC, MLRS. Methodology: AH, MM. Project administration: AH, MM, CO. Software: AH. Supervision: MM. Validation: MM. Visualization: AH. Writing-original draft: AH, MM. Writing-review & editing: AH, MM and KA. Verification of the underlying data: AH, MM. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Data sharing statement

Non-identifying data supporting the claims made in this paper are available upon request after its publication. Requests should be addressed to the corresponding authors of this paper: Prof Micheline Misrahi (micheline.misrahi@aphp.fr).

Declaration of interests

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by Université Paris Sud-Paris Saclay, Hôpitaux Universitaires Paris Saclay (AH, MM), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale-INSERM (AH, MM), and by the Agence Nationale de Biomédecine (AH, MM). We thank the molecular & genetics Platform facility of GHU APHP Paris-Saclay for access to instruments and technical facilities.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ebiom.2022.104246.

References

1 Huhtaniemi I, Hovatta O, La Marca A, et al. Advances in the molecular pathophysiology, genetics, and treatment of primary ovarian insufficiency. *Trends Endocrinol Metab.* 2018;29:400–419. https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.03.010.
2 Golezar S, Ramezani Tehrani F, Khazaei S, Ebadi A, Keshavarz Z. The global prevalence of primary ovarian insufficiency and early menopause: a meta-analysis. *Climacteric.* 2019;22:403–411. https://doi.org/10.1080/13697137.2019.1574738.
3 Bachelot A, Nicolas C, Bidet M, et al. Long-term outcome of ovarian function in women with intermittent premature ovarian insufficiency. *Clin Endocrinol.* 2017;86:223–228. https://doi.org/10.1111/cen.13105.
4 Stentz NC, Koelper N, Barnhart KT, Sammel MD, Senapati S. Infertility and mortality. *Am J Obstet Gynecol.* 2020;222:251.e1–251.e10. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.09.007.
5 Wang Y-X, Farland LV, Wang S, et al. Association of infertility with premature mortality among US women: Prospective cohort study. *Lancet Reg Health Am.* 2021;7:100122. https://doi.org/10.1016/j.lana.2021.100122.
6 Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17:405–424. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30.
7 Heddar A, Beckers D, Fouquet B, Roland D, Misrahi M. A novel phenotype combining primary ovarian insufficiency growth retardation and pilomatricomas with MCM8 mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105:1973–1982. https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa155.
8 Heddar A, Guichoux N, Auger N, Misrahi M. A SPIDR homozygous nonsense pathogenic variant in isolated primary ovarian insufficiency with chromosomal instability. *Clin Genet.* 2021;101:242–246. https://doi.org/10.1111/cge.14080.

9 Fouquet B, Pawlikowska P, Caburet S, et al. A homozygous FANCM mutation underlies a familial case of non-syndromic primary ovarian insufficiency. *Elife*. 2017;6:e30490. https://doi.org/10.7554/eLife.30490.

10 Gordeeva V, Sharova E, Arapidi G. Progress in methods for copy number variation profiling. *Int J Mol Sci*. 2022;23:2143. https://doi.org/10.3390/ijms23042143.

11 Oostra AB, Nieuwint AWM, Joenje H, de Winter JP. Diagnosis of fanconi anemia: chromosomal breakage analysis. *Anemia*. 2012;2012:238731. https://doi.org/10.1155/2012/238731.

12 Caburet S, Heddar A, Dardillac E, et al. Homozygous hypomorphic BRCA2 variant in primary ovarian insufficiency without cancer or Fanconi anaemia trait. *J Med Genet*. 2020;58:125–134. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106672.

13 Prueitt RL, Ross JL, Zinn AR. Physical mapping of nine Xq translocation breakpoints and identification of XPNPEP2 as a premature ovarian failure candidate gene. *Cytogenet Cell Genet*. 2000;89:44–50. https://doi.org/10.1159/000015560.

14 Ellwanger K, Becker E, Kienes I, et al. The NLR family pyrin domain-containing 11 protein contributes to the regulation of inflammatory signaling. *J Biol Chem*. 2018;293:2701–2710. https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000152.

15 Stolk L, Perry JRB, Chasman DI, et al. Meta-analyses identify 13 loci associated with age at menopause and highlight DNA repair and immune pathways. *Nat Genet*. 2012;44:260–268. https://doi.org/10.1038/ng.1051.

16 Luo X, Xu J, Zhao R, et al. The role of inactivated NF-κB in premature ovarian failure. *Am J Pathol*. 2022;192:468–483. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.12.005.

17 Kato Y, Iwamori T, Ninomiya Y, et al. ELAVL2-directed RNA regulatory network drives the formation of quiescent primordial follicles. *EMBO Rep*. 2019;20:e48251. https://doi.org/10.15252/embr.201948251.

18 Hustedt N, Saito Y, Zimmermann M, et al. Control of homologous recombination by the HROB-MCM8-MCM9 pathway. *Genes Dev*. 2019;33:1397–1415. https://doi.org/10.1101/gad.329508.119.

19 Han X, Zhao L, Li X. HELQ in cancer and reproduction. *Neoplasma*. 2016;63:825–835. https://doi.org/10.4149/neo_2016_601.

20 Tsubouchi H, Argunhan B, Ito K, Takahashi M, Iwasaki H. Two auxiliary factors promote Dmc1-driven DNA strand exchange via stepwise mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117:12062–12070. https://doi.org/10.1073/pnas.1917419117.

21 Jolly A, Bayram Y, Turan S, et al. Exome sequencing of a primary ovarian insufficiency cohort reveals common molecular etiologies for a spectrum of disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104:3049–3067. https://doi.org/10.1210/jc.2019-00248.

22 Argunhan B, Murayama Y, Iwasaki H. The differentiated and conserved roles of Swi5-Sfr1 in homologous recombination. *FEBS Lett*. 2017;591:2035–2047. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12656.

23 Duesbery NS, Choi T, Brown KD, et al. CENP-E is an essential kinetochore motor in maturing oocytes and is masked during mos-dependent, cell cycle arrest at metaphase II. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:9165–9170. https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9165.

24 Zhang Y, Xu X, Hu M, Wang X, Cheng H, Zhou R. SPATA33 is an autophagy mediator for cargo selectivity in germline mitophagy. *Cell Death Differ*. 2021;28:1076–1090. https://doi.org/10.1038/s41418-020-00638-2.

25 Banu SK, Stanley JA, Sivakumar KK, Arosh JA, Barhoumi R, Burghardt RC. Identifying a novel role for X-prolyl aminopeptidase (Xpnpep) 2 in CrVI-induced adverse effects on germ cell nest breakdown and follicle development in rats. *Biol Reprod*. 2015;92:67. https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.125708.

26 van Erven B, Berry GT, Cassiman D, et al. Fertility in adult women with classic galactosemia and primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril*. 2017;108:168–174. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.05.013.

27 Morrell NW, Aldred MA, Chung WK, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2019;53:1801899. https://doi.org/10.1183/13993003.01899-2018.

28 Persani L, Rossetti R, Di Pasquale E, Cacciatore C, Fabre S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum Reprod Update*. 2014;20:869–883. https://doi.org/10.1093/humupd/dmu036.

29 Huang K, Dang Y, Zhang P, et al. CAV1 regulates primordial follicle formation via the Notch2 signalling pathway and is associated with premature ovarian insufficiency in humans. *Hum Reprod*. 2018;33:2087–2095. https://doi.org/10.1093/humrep/dey299.

30 Girerd B, Montani D, Jaïs X, et al. Genetic counselling in a national referral centre for pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2016;47:541–552. https://doi.org/10.1183/13993003.00717-2015.

31 Hamid R, Cogan JD, Hedges LK, et al. Penetrance of pulmonary arterial hypertension is modulated by the expression of normal BMPR2 allele. *Hum Mutat*. 2009;30:649–654. https://doi.org/10.1002/humu.20922.

32 Patiño LC, Silgado D, Laissue P. A potential functional association between mutant BMPR2 and primary ovarian insufficiency. *Syst Biol Reprod Med*. 2017;63:145–149. https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1291767.

33 Girerd B, Coulet F, Jaïs X, et al. Characteristics of pulmonary arterial hypertension in affected carriers of a mutation located in the cytoplasmic tail of bone morphogenetic protein receptor type 2. *Chest*. 2015;147:1385–1394. https://doi.org/10.1378/chest.14-0880.

34 Luan Y, Xu P, Yu S-Y, Kim S-Y. The role of mutant p63 in female fertility. *Int J Mol Sci*. 2021;22:8968. https://doi.org/10.3390/ijms22168968.

35 Tucker EJ, Gutfreund N, Belaud-Rotureau M-A, et al. Dominant TP63 missense variants lead to constitutive activation and premature ovarian insufficiency. *Hum Mutat*. 2022. https://doi.org/10.1002/humu.24432.

36 Rodríguez-López C, García-Cárdaba LM, Blázquez A, et al. Clinical, pathological and genetic spectrum in 89 cases of mitochondrial progressive external ophthalmoplegia. *J Med Genet*. 2020;57:643–646. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106649.

37 Fridman H, Yntema HG, Mägi R, et al. The landscape of autosomal-recessive pathogenic variants in European populations reveals phenotype-specific effects. *Am J Hum Genet*. 2021;108:608–619. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.03.004.

38 Zhu J, Jiang L, Liu Y, et al. MAPK and NF-κB pathways are involved in bisphenol A-induced TNF-α and IL-6 production in BV2 microglial cells. *Inflammation*. 2015;38:637–648. https://doi.org/10.1007/s10753-014-9971-5.

39 Zhang Y, Yan Z, Qin Q, et al. Transcriptome landscape of human folliculogenesis reveals oocyte and granulosa cell interactions. *Mol Cell*. 2018;72:1021–1034.e4. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.029.

40 Ruth KS, Day FR, Hussain J, et al. Genetic insights into biological mechanisms governing human ovarian ageing. *Nature*. 2021;596:393–397. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03779-7.

41 Katari S, Aarabi M, Kintigh A, et al. Chromosomal instability in women with primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod*. 2018;33:531–538. https://doi.org/10.1093/humrep/dey012.

42 Klionsky DJ, Petroni G, Amaravadi RK, et al. Autophagy in major human diseases. *EMBO J*. 2021;40:e108863. https://doi.org/10.15252/embj.2021108863.

43 Eskenazi S, Bachelot A, Hugon-Rodin J, et al. Next generation sequencing should be proposed to every woman with "idiopathic" primary ovarian insufficiency. *J Endocr Soc*. 2021;5:bvab032. https://doi.org/10.1210/jendso/bvab032.

44 Bouilly J, Beau I, Barraud S, et al. Identification of multiple gene mutations accounts for a new genetic architecture of primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101:4541–4550. https://doi.org/10.1210/jc.2016-2152.

45 Bouilly J, Bachelot A, Broutin I, Touraine P, Binart N. Novel NOBOX loss-of-function mutations account for 6.2% of cases in a large primary ovarian insufficiency cohort. *Hum Mutat*. 2011;32:1108–1113. https://doi.org/10.1002/humu.21543.

46 Gorsi B, Hernandez E, Moore MB, et al. Causal and candidate gene variants in a large cohort of women with primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;107:685–714. https://doi.org/10.1210/clinem/dgab775.

47 Heddar A, Misrahi M. Genetics of primary ovarian insufficiency: a careful step-by-step approach based on solid foundations to bring new knowledge. *Fertil Steril*. 2022;118:421–424. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.05.024.

48 Li L, Wang B, Zhang W, et al. A homozygous NOBOX truncating variant causes defective transcriptional activation and leads to primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod*. 2017;32:248–255. https://doi.org/10.1093/humrep/dew271.

49 Sassi A, Désir J, Duerinckx S, et al. Compound heterozygous null mutations of NOBOX in sisters with delayed puberty and primary amenorrhea. *Mol Genet Genomic Med*. 2021;9:e1776. https://doi.org/10.1002/mgg3.1776.

50 França MM, Funari MFA, Lerario AM, et al. A novel homozygous 1-bp deletion in the NOBOX gene in two Brazilian sisters with

primary ovarian failure. *Endocrine*. 2017;58:442–447. https://doi.org/10.1007/s12020-017-1459-2.
51 Jiao S-Y, Yang Y-H, Chen S-R. Molecular genetics of infertility: loss-of-function mutations in humans and corresponding knockout/mutated mice. *Hum Reprod Update*. 2021;27:154–189. https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa034.
52 Massin N, Méduri G, Bachelot A, Misrahi M, Kuttenn F, Touraine P. Evaluation of different markers of the ovarian reserve in patients presenting with premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;282:95–100. https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.11.017.
53 Mayer A, Fouquet B, Pugeat M, Misrahi M. BMP15 "knockout-like" effect in familial premature ovarian insufficiency with persistent ovarian reserve. *Clin Genet*. 2017;92:208–212. https://doi.org/10.1111/cge.12970.
54 Vo KCT, Kawamura K. In vitro activation early follicles: from the basic science to the clinical perspectives. *Int J Mol Sci*. 2021;22:3785. https://doi.org/10.3390/ijms22073785.
55 Krausz C, Riera-Escamilla A, Moreno-Mendoza D, et al. Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic men. *Genet Med*. 2020;22:1956–1966. https://doi.org/10.1038/s41436-020-0907-1.
56 Alhathal N, Maddirevula S, Coskun S, et al. A genomics approach to male infertility. *Genet Med*. 2020;22:1967–1975. https://doi.org/10.1038/s41436-020-0916-0.
57 Krausz C, Riera-Escamilla A, Chianese C, et al. From exome analysis in idiopathic azoospermia to the identification of a high-risk subgroup for occult Fanconi anemia. *Genet Med*. 2019;21:189–194. https://doi.org/10.1038/s41436-018-0037-1.
58 Caburet S, Arboleda VA, Llano E, et al. Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N Engl J Med*. 2014;370:943–949. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1309635.
59 Heddar A, Dessen P, Flatters D, Misrahi M. Novel STAG3 mutations in a Caucasian family with primary ovarian insufficiency. *Mol Genet Genomics*. 2019;294:1527–1534. https://doi.org/10.1007/s00438-019-01594-4.
60 Riera-Escamilla A, Enguita-Marruedo A, Moreno-Mendoza D, et al. Sequencing of a "mouse azoospermia" gene panel in azoospermic men: identification of RNF212 and STAG3 mutations as novel genetic causes of meiotic arrest. *Hum Reprod*. 2019;34:978–988. https://doi.org/10.1093/humrep/dez042.
61 Smirin-Yosef P, Zuckerman-Levin N, Tzur S, et al. A biallelic mutation in the homologous recombination repair gene SPIDR is associated with human gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102:681–688. https://doi.org/10.1210/jc.2016-2714.
62 Zangen D, Kaufman Y, Zeligson S, et al. XX ovarian dysgenesis is caused by a PSMC3IP/HOP2 mutation that abolishes coactivation of estrogen-driven transcription. *Am J Hum Genet*. 2011;89:572–579. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.09.006.
63 Al-Agha AE, Ahmed IA, Nuebel E, et al. Primary ovarian insufficiency and azoospermia in carriers of a homozygous PSMC3IP stop gain mutation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103:555–563. https://doi.org/10.1210/jc.2017-01966.
64 Wang J, Zhang W, Jiang H, Wu B-L, Primary Ovarian Insufficiency Collaboration. Mutations in HFM1 in recessive primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med*. 2014;370:972–974. https://doi.org/10.1056/NEJMc1310150.
65 Kasak L, Punab M, Nagirnaja L, et al. Bi-allelic recessive loss-of-function variants in FANCM Cause non-obstructive azoospermia. *Am J Hum Genet*. 2018;103:200–212. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.07.005.
66 Oud MS, Smits RM, Smith HE, et al. A de novo paradigm for male infertility. *Nat Commun*. 2022;13:154. https://doi.org/10.1038/s41467-021-27132-8.
67 Vissers LELM, de Ligt J, Gilissen C, et al. A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet*. 2010;42:1109–1112. https://doi.org/10.1038/ng.712.

SUPPLEMENTAL APPENDIX

Genetic landscape in a large cohort of Primary Ovarian Insufficiency. New genes/pathways and implication for personalized medicine

Supplemental Materials and Methods:

1. **Molecular genetics studies**

a) Whole exome sequencing

Whole exome sequencing studies (WES) were performed on genomic DNA extracted from the peripheral blood of the propositae and available affected and unaffected sisters and mothers. Library preparation, exome capture, sequencing, and data processing were performed by IntegraGen SA (Evry, France) according to their in-house procedures. Data analysis was performed as described in our previous studies (Fouquet *et al.*, 2017b; Heddar *et al.*, 2019b, 2020b; Caburet *et al.*, 2020b). In brief, exon enrichment was performed on 600 ng of DNA, using the Agilent SureSelect Human All Exons kit version CRE (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Exon-enriched libraries were subjected to 75 bp paired-end sequencing on a HiSeq2500, according to the manufacturer's protocol. Read alignment to the human reference genome (GRCh38) and variant calling were performed using the Illumina pipeline (CASAVA 1.8.2). Variant annotation was performed using Ensembl's Variant Effect Predictor. The variants were filtered using SIRIUS, an IntegraGen in-house pipeline platform.

Filtration according to the mode of inheritance is a powerful method. Therefore, the exomes of affected patients were compared to the exomes of selected and available affected and non-affected members of the family. The exome analysis was performed as follows: In the presence of known or suspected consanguinity, we focused on all rare homozygous variants identified in the patient's exome. In fact, each exome contained approximately 10–20 rare homozygous

variants. When parents' exomes were available, we confirmed the presence of the variant in the heterozygous state in one or both parents. The causal variant was identified using a combination of *in silico* bioinformatic predictors and bibliographic research (regarding gene function, expression, animal model described, etc.). In the absence of inbreeding, we tested the hypothesis of a recessive mode of transmission but with two compound heterozygous pathogenic variants; these variants occur in the same gene, each of which is transmitted by one of the two parents. We therefore performed a comparative study of the patient's exome with that of the parents or her available relatives. Furthermore, we tested the dominant mode of transmission of a paternal gene variant—which had no effect on male fertility—transmitted to the proposita and affected sisters and absent in the unaffected sisters. Finally, and although rarely described in POI, we tested the *de novo* hypothesis (variant present only in the proposita and absent from WES of both parents when the latter were available).

b) Targeted next generation sequencing

A custom-made targeted NGS study, including all known genes involved in POI(Huhtaniemi *et al.*, 2018b), was performed in proposita and available relatives. We also included genes previously suggested to be associated with the age of menopause by genome-wide association studies (GWAS) and selected POI candidate genes. Libraries were prepared using an NEB Next Prep Master Mix Set for Illumina (NEB Inc). Enrichment was performed on 500 ng of DNA using a Sure Select XT Reagent Kit (Agilent). Libraries were subjected to 75 bp paired-end sequencing on a MiSeq2500 according to the manufacturer's protocol. Data analysis was performed using an automated bioinformatics pipeline implemented with a local Galaxy instance at Bicêtre Hospital, France. In brief, alignment to the human reference genome 19 (GRCh37) was performed using BWA–MEM 0.7.10. Variant calling was performed using GATK 3.4-46, and single nucleotide variants were annotated using both Annovar 2015-06-17 and Snpeff 4.0. Variants detected were processed using the following

bioinformatic filters: (i) variants with a read coverage under 5× and a Q score <20 were filtered out, and (ii) variations against ExAC databases were filtered using a minor allelic frequency (MAF) of 0.02. The short list of variants with an MAF <0.02 according to the ExAC database was then manually annotated using dbNSFP, an integrated database including a wide range of *in silico* predictors and all human polymorphism databases, notably gnomAD (Liu *et al.*, 2016). Variant classification according to the ACMG-AMP 2015 guideline was performed using InterVar (Li and Wang, 2017) (https://wintervar.wglab.org/) and Varsome (Kopanos *et al.*, 2019) (https://varsome.com/).

c) NGS Studies in familial POI: In our cohort 70 proposita belonging to 70 different families have been included. For 24 non- consanguineous patients, mainly of European origin (16 Europeans, 5 North Africans, 2 Africans and 1 Asian), no family member (parents, sisters, cousins) was available for exome studies. A targeted –NGS (T-NGS) was performed. For 46 other families either consanguineous or with available relatives, 13 were studied in our laboratory in 2017 before the implementation of our efficient in-house targeted NGS. We used WES first to study those families. The 33 other patients had T-NGS first after its development, followed by WES in case T-NGS was negative.

c) Sanger Genomic Sequencing

Direct genomic Sanger sequencing was performed in the proposita and the available relatives to confirm the relevant pathogenic variant and to specify the inheritance.

Supplemental Figures

Fig.S1: Clinical characteristics of our cohort of patients with POI. A. Sporadic or familial cases. **B**. Menses; PA: Primary Amenorrhea, SA: Secondary Amenorrhea, SP: Spaniomenorrhea. **C.** Initial clinical presentation: isolated/non-syndromic (dark blue); syndromic with other extra ovarian features (light blue). **D.** Ethnic origin of the patients.

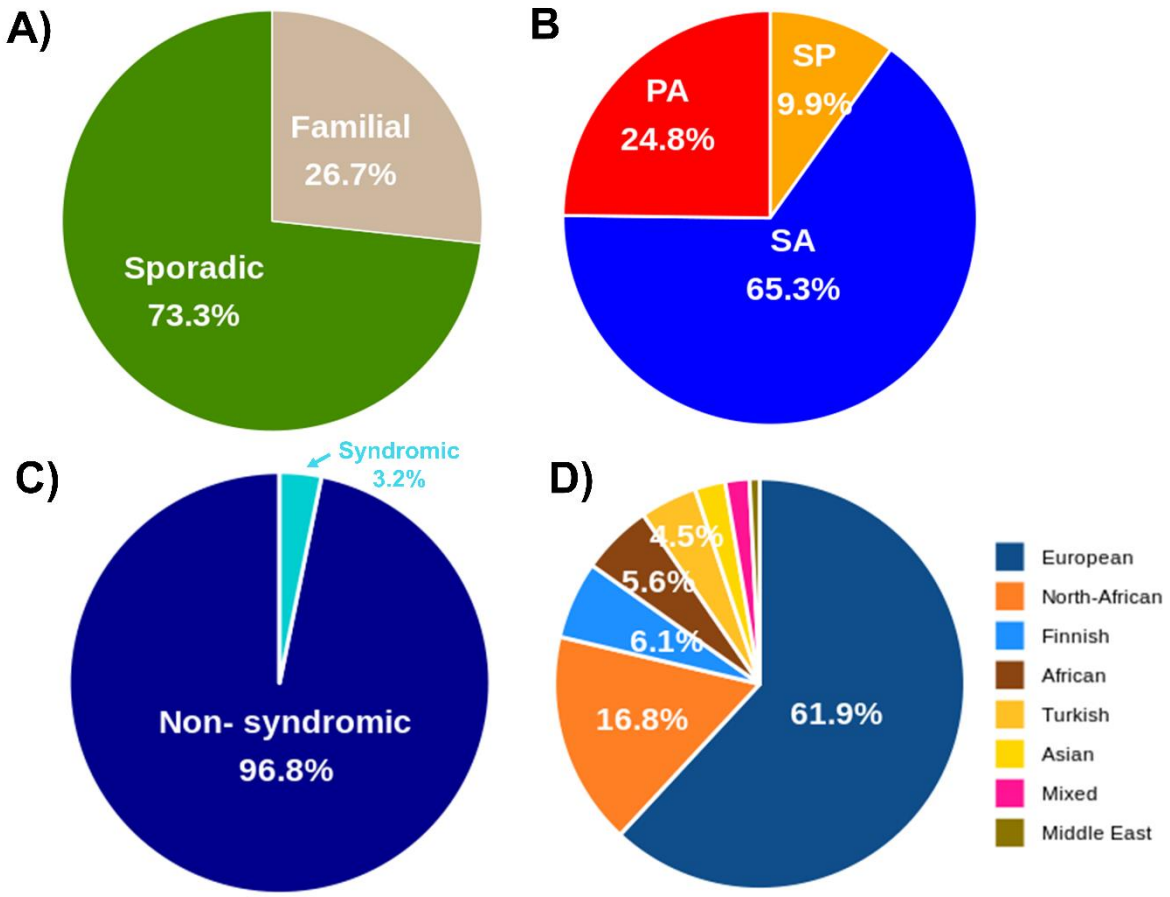
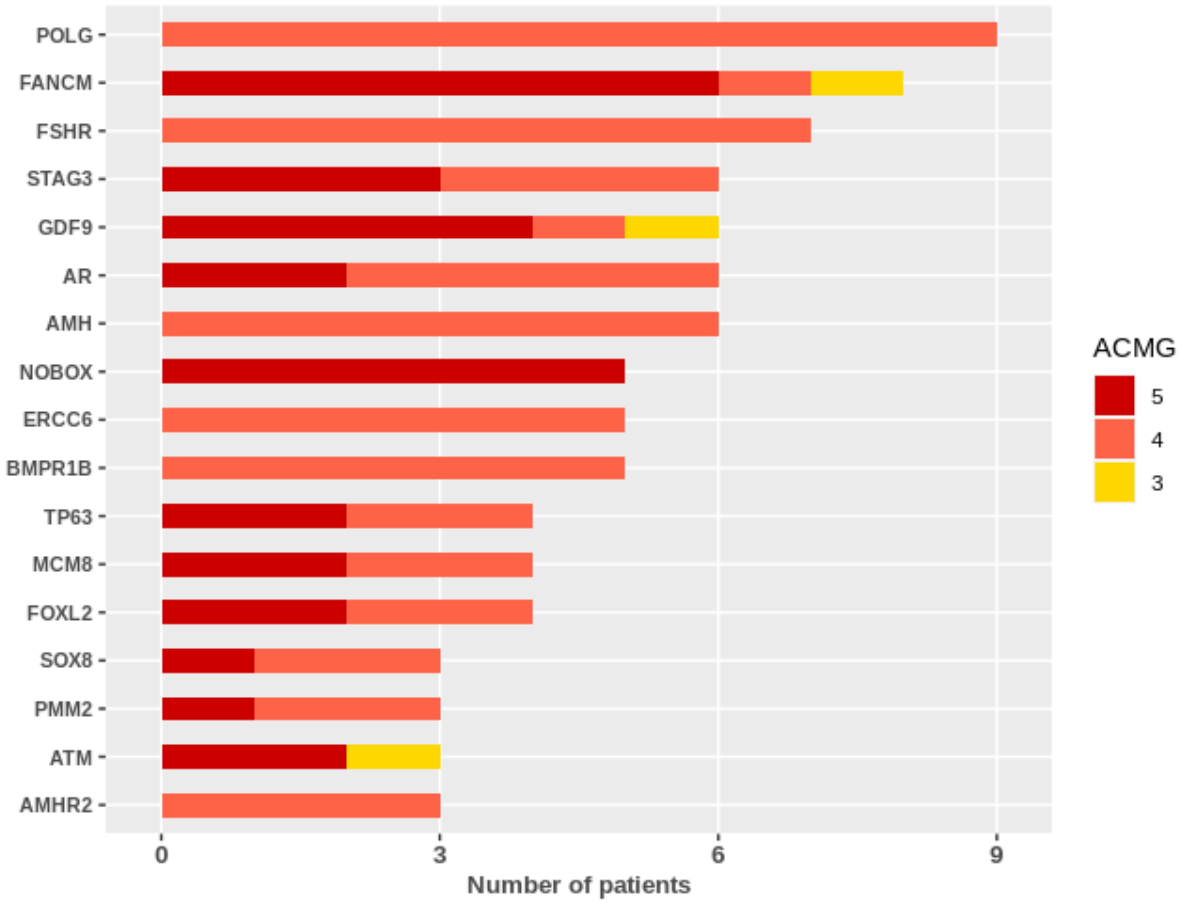


Fig.S2: Most recurrent genes in the cohort. Genes with variant in more than three patients are represented. Variants are classified according to ACMG criteria. Only Pathogenic and Likely pathogenic variants are considered for the genetic diagnosis as recommended by the ACMG.



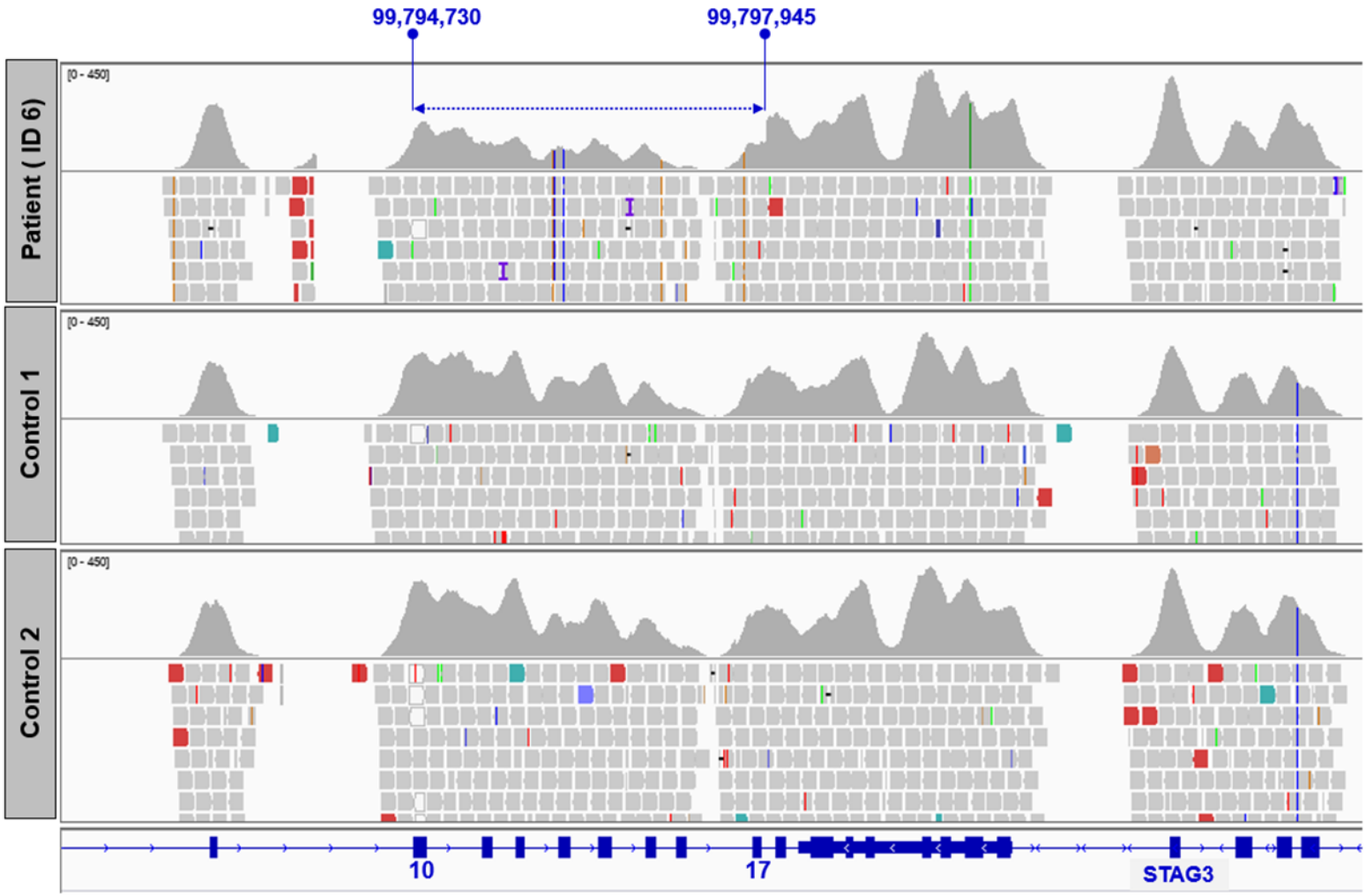


Figure S3: **intragenic deletion of *STAG3*.** Targeted-NGS data is visualized with IGV (*integrative genomics viewer*) centered on *STAG3*.
The patient (ID 6) has an intragenic deletion of *STAG3* detected by an in-house pipeline based on coverage, to detect Copy Number Variation (CNV). The deletion has a size of 3215 pb (3,2Kbp) (Coordinates according to hg 19: 99,794,730-99,797,945) and extends from exon 10 to exon 17 of STAG3

Supplemental Tables

(Tables S1, S6 and S7 are larger tables added as separate Excel files)

Table S2: Clinical characteristics of the Cohort

Age at diagnosis (Years)	**N**	**%**
Mean age	*25,54[12-40]*	
Ethnicity		
European	232	61,9 %
North- African	63	16,8 %
Finnish	23	6,1 %
African	21	5,6 %
Asian	9	2,4 %
Turkish	17	4,5 %
Middle East	3	0,8 %
Mixed	7	1,9 %
Initial clinical presentation		
Isolated POI	363	96,8%
Syndromic POI	12	3,2%
Menses		
Primary Amenorrhea (PA)	*93*	24,8%
Secondary Amenorrhea (SA)	*245*	65,3%
Spaniomenorrhea (SP)	*37*	9,9%
Pregnancy before POI (SA or SP)		
Yes spontaneously	**81**	**21,6%**
1 pregnancy	*46*	12,3%
2 pregnancies	*28*	7,5%
3 pregnancies	*5*	1,3%
4 pregnancies	*2*	0,5%
Yes with IVF	**5**	**1,3%**
1 pregnancy	*4*	1,1%
2 pregnancies	*1*	0,2%
No	**279**	**74,4%**
Unkown	10	2,7%
Hormonal Assays		
FSH (IU/l)	76,5[25-244]	
LH (IU/l)	37,34 [4,6-143]	
Estradiol (IU/l)	48,24[0 -430]	
AMH (ng/l)	0,31[0-8,3]	

Table S3: Associated clinical features in patients with syndromic POI

ID	Ethnicity	Age	Menses	Phenotype	Gene	Anomalie	Status	Known syndrome
92	European	27	SP	Blepharophimosis, epicanthus inversus, and ptosis	**FOXL2**	NM_023067.4:c.655C>T : p.Gln219Ter	Het	**BPES**
242	European	34	SA	Blepharophimosis, epicanthus inversus, and ptosis	**FOXL2**	NM_023067.4:c.196G>A : p.Ala66Thr	Het	**BPES**
324	European	28	SP	Blepharophimosis, epicanthus inversus, and ptosis	**FOXL2**	NM_023067.4:c.576del : p.Lys193SerfsTer78	Het	**BPES**
175	European	27	SA	Hypoparathyroidism	**AIRE**	NM_000383.4:c.769C>T : p.Arg257Ter & c.967_979del : p.Leu323SerfsTer51	Comp Het	**APECED**
272	European	13	PA	Mild Intellectual disability, Sensorineural hearing loss, hyperthroidism	**RCBTB1**	NM_018191.4:c.1271T>G :p.Phe424Cys & c.962C>T : p.Pro321Leu	Comp Het	**Syndromic retinal dystrophy**
182	African	27	SA	Marinesco-Sjogren syndrome	**SIL1**	NM_022464.5 :c.1249C>T : p.Gln417Ter	Hom	**Marinesco-Sjogren syndrome**
315	Turkish	14	PA	Intra uterine growth retardation (IUGR), Hypothyroidism, pilomatricomas	**MCM8**	NM_032485.6 : c.925C>T:p.Arg309Ter	Hom	**IUGR, Hypothyroidism, pilomatricomas**
104	European	16	PA	Single kidney, Haschimoto's thyroiditis, Ptosis, Scoliosis	**NI**	-	-	**-**
115	European	13	PA	Horseshoe kidney epilepsy	**NI**	-	-	**-**
139	European	18	PA	Keratoconus	**NI**	-	-	**-**
235	European	12	PA	Marfanoid habitus , scoliosis, hyperlaxity	**NI**	-	-	**-**

PA: Primary Amenorrhea; SA: Secondary Amenorrhea; SP: Spaniomenorrhea. Age: age at diagnosis. NI: Not identified.

Table S4: Diagnostic performance according to patient's ethnicity

	Positive	Carrier	VUS	Negative	Total
European	61 (26,3%)	15 (6,5%)	44(19%)	112 (48.2%)	**232**
North African	16	3	21	23	**63**
Finnish	11	1	1	10	**23**
African	6	3	4	8	**21**
Asian	4	1	3	1	**9**
Turkish	8	1	5	3	**17**
Midle East	2	0	0	1	**3**
Mixed	2	1	2	2	**7**
Total	**110 (29,3%)**	**25(6,7%)**	**80(21,3%)**	**160 (41,7%)**	**375**

Vus: variant of unknown significance

Table S5: Classification of variants detected in the cohort of patients with POI

	N	%
ACMG Classification		
Pathogenic	51	23,6%
Likely Pathogenic	62	28,7%
Unkown significance	104	47,7%
Haplotype		
Heterozygous	144	66,3%
Homozygous	28	12,9%
Compound Heterozygous	24	11,1%
Presumed compound heterozygous	21	9,7%
Type of variant		
Missense	159	73,2%
Frameshift	24	11,1%
Stopgain	24	11,1%
Inframe deletion	6	2,8%
Splice	3	1,4%
Start lost	1	0,4%
Total	**217**	**100%**

Table S8: Quantification of chromosomal breaks in patients with POI and novel DNA repair -genes

	Gene	Genotype	Aberrant metaphases			Breaks/ metaphase			Radial figures		
			Untreated	MMC (150 nM)	MMC (300 nM)	Untreated	MMC (150 nM)	MMC (300 nM)	Untreated	MMC (150 nM)	MMC (300 nM)
Control 1	**WT**	WT	0/50 (0%)	1/50 (2%)	1/50 (2%)	0	1/50 (0,02)	7/50 (0,14)	0/50 (0%)	0/50 (0%)	0/50 (0%)
Patient 1*	**BRCA2-R2842C**	Hom	1/50 (2%)	5/50 10%)	9/50 (18%)	1/50 (0,02)	7/50 (0,14)	19/50 (0,38)	0/50 (0%)	2/50 (4%)	2/50 (4%)
Mother*	**BRCA2-R2842C**	Het	0/50 (0%)	3/50 (6%)	2/50 (4%)	0	5/50 (0,1)	10/50 (0,2)	0/50 (0%)	2/50 (4%)	1/50 (2%)
Patient 2	**HELQ**	Hom	3/50 (6%)	23/50 (46%)	41/50 (82%)	4/50 (0,08)	64/50 (1,28)	199/50 (3,98)	1/50 (2%)	8/50 (16%)	26/50 (52%)
Mother	**HELQ**	Het	1/50 (2%)	3/50 (6%)	28/50 (56%)	3/50 (0,06)	8/50 (0,16)	61/50 (1,22)	0/50 (0%)	2/50 (4%)	4/50 (8%)
Patient 3	**HROB**	Hom	5/50 (10%)	43/50 (86%)	19/19 (100%)	6/50 (0,12)	190/50 (3,8)	309/19 (16,26)	0/50 (0%)	numerous	extremely numerous
Patient 4	**SWI5**	Hom	0/50 (0%)	19/50 (38%)	45/50 (90%)	0	40/50 (0,8)	450/50 (9)	0/50	4/50 (8%)	49/50 (98%)
Patient 5	**Fanconi anemia**	Hom	4/50 (8%)	48/50 (96%)	30/30 (100%)	4/50 (0,08)	437/50 (8,74)	>30	0/50 (0%)	numerous	extremely numerous

WT: wild type, Hom: Homozygous, Het : heterozygous.* Previous reported patient and her mother with the hypomorphic variant of BRCA2 (R2842C)[4.] . Note that patient with homozygous pathogenic variants of HROB have the highest chromosomal breaks (radial figures and breaks /metaphase) closed to what is observed in Fanconi anemia cells.

Table S9: Patients initially presenting isolated POI with Pathogenic or Likely Pathogenic variants in genes causing syndromic POI

ID	**Ethnicity**	**Menses (ages)**	**Gene**	**Variant**	**Status**	**ACMG**	**Pathway**	**Related syndrome and associated symptoms**
24	European	SA (21)	GALT	NM_000155.4 :c.563A>G:p.Gln188Arg	Hom	5	Metabolism	Galactosemia: cataract, mild intellectual disability, feeding difficulties, poor weight gain and growth, lethargy, and jaundice.
9*	European	SA (39)	POLG	NM_001126131.2:c.2528A>G:p.Gln843Arg	Het	4	Mitochondria	Progressive external ophthalmoplegia,Parkinsonism,
152*	European	SP (32)	POLG	NM_001126131.2:c.2528A>G : p.Gln843Arg	Het	4	Mitochondria	Progressive external ophthalmoplegia,Parkinsonism,
85	European	SA (33)	POLG	NM_001126131.2:c.2492A>G : p.Tyr831Cys	Het	4	Mitochondria	Progressive external ophthalmoplegia, autosomal dominant
133	European	SA (38)	POLG	NM_001126131.2:c.2492A>G : p.Tyr831Cys	Het	4	Mitochondria	Progressive external ophthalmoplegia,Parkinsonism,
			PCCB	NM_000532.5:c.911C>T: p.Thr304Ile	Het	4	Metabolism	Propionicacidemia : poor feeding, pancytopenia, dystonia, psychomotor delay,seizures and cardiomyopathy
190	Finnish	SA	POLG	NM_001126131.2:c.2492A>G : p.Tyr831Cys	Het	4	Mitochondria	Progressive external ophthalmoplegia,Parkinsonism,
241	North-African	SA (34)	POLG	NM_001126131.2:c.1550G>T : p.Gly517Val	Het	4	Mitochondria	Progressive external ophthalmoplegia,Parkinsonism,
278	European	SA (34)	POLG	NM_001126131.2:c.1550G>T:p.Gly517Val	Het	4	Mitochondria	Progressive external ophthalmoplegia,Parkinsonism,
52	European	SA (29)	PMM2	NM_000303.3:c.422G>A:p.Arg141His	Comp Htz	5	Metabolism	
				NM_000303.3: c.91T>C :p.Phe31Leu		4	Metabolism	

300	North-African	SA (16)	PMM2	NM_000303.3:c.95T>G:p.Leu32Arg	Hom	4	Metabolism	Congenital disorder of glycosylation, type Ia: Intellectual disability, hypotonia, growth retardation and seizures, and multiple organ failure.
301	North-African	SA (16)	PMM2	NM_000303.3:c.95T>G:p.Leu32Arg	Hom	4	Metabolism	
276	European	SA (28)	**PCCB**	**NM_000532.5:c.911C>T : p.Thr304Ile**	**Pres Comp Htz**	**4**	Metabolism	Propionicacidemia : poor feeding, pancytopenia, dystonia, psychomotor delay,seizures and cardiomyopathy
				NM_000532.5: c.1490C>T : p.Ala497Val		**3**	Metabolism	
186	Finnish	SA	**LMNA**	**NM_170707.4:c.1256G>T : p.Arg419Leu**	**Het**	**4**	Metabolism	Cardiomyopathy, dilated, 1A; Hutchinson-Gilford progeria
43	Turkish	PA	CYP19A1	NM_000103.4:c.568dupC:p.Leu190ProfsTer11	Hom	5	Metabolism	Aromatase deficiency syndrome : pseudohermaphroditism and virilization in women; and tall stature, osteoporosis and obesity in men
44	Turkish	PA	CYP19A1	NM_000103.4:c.568dupC:p.Leu190ProfsTer11	Hom	5	Metabolism	
130	European	SA (20)	TWNK	NM_021830.5:c.904C>T:p.Arg302Trp	Het	4	Mitochondria	Progressive external ophthalmoplegia with mitochondrial DNA deletions, autosomal dominant, Perrault syndrome.
			FANCM	NM_020937.4:c.5791C>T : p.Arg1931Ter	Het	5	DNA repair & Meiosis	Breast-ovarian cancer, familial,Fanconi Anemia
247	North-African	SP (23)	WT1	NM_024426:c.299C>G:p.Ala100Gly	Het	4	Follicular growth	Denys-Drash syndrome,Frasier syndrome: Disorder of Sex developement, Nephrotic syndormic, nephroblastoma.
255	North-African	SA (24)	WT1	NM_024426: c.299C>G:p.Ala100Gly	Het	4	Follicular growth	
140	European	PA	BMPR1A	NM_004329.3:c.1327C>T : p.Arg443Cys	Het	4	Follicular growth	Hereditary mixed polyposis syndrome
112	Turkish	SA (14)	**CAV1**	**NM_001172895.1:c.1A>G: p.Met1Val**	**Het**	**5**	Follicular	Pulmonary Arterial hypertension: Lipodystrophy,

							growth	familial partial
163	European	SA (21)	**BMPR2**	**NM_001204.7:c.1967T>C : p.Leu656Ser**	**Het**	**4**	Follicular growth	Pulmonary Arterial hypertension
275	European	PA	**BMPR2**	**NM_001204.7:c.1790G>A : p.Arg597Gln**	Het	4	Follicular growth	Pulmonary Arterial hypertension
			AMH	NM_000479.5:c.35T>G :p.Val12Gly	Het	4	Follicular growth	
76	Middle East	SA (19)	**FOXL2**	**NM_023067.4:c.1049A>T : p.Gln350Leu**	**Het**	**4**	Follicular growth	BPES: Blepharophimosis, epicanthus inversus, and ptosis ,POI
198	Finnish	PA	**TP63**	**NM_003722.5:c.191+2T>G:p.?**	**Het**	**5**	DNA repair & Meiosis	Ectrodactyly, ectodermal dysplasia, cleft lip or palate syndrome
224	African	PA	TP63	NM_003722.5:c.674T>C:p.Ile225Thr	Het	4	DNA repair & Meiosis	
			BLM	**NM_000057.4:c.772_773delCT:p.Leu258GlufsTer7**	**Het**	**5**	DNA repair & Meiosis	Bloom syndrome : pre- and postnatal growth deficiency, a telangiectatic erythematous rash; predisposition to early onset cancer
262	North-African	SA (27)	TP63	NM_003722:c.1697C>T:p.Thr566Met	Het	4	DNA repair & Meiosis	Ectrodactyly, ectodermal dysplasia, cleft lip or palate
336	European	SA (38)	TP63	NM_003722:c.640A>G :p.Lys214Glu	Het	4	DNA repair & Meiosis	Ectrodactyly, ectodermal dysplasia, cleft lip or palate
318	Turkish	PA	BRCA2	NM_000059.4:c.8524C>T :p.Arg2842Cys	Hom	4	DNA repair & Meiosis	Breast-ovarian cancer, familial / Fanconi Anemia
280	North-African	PA	BRCA2	NM_000059.4:c.7234_7235insG : p.Thr2412SerfsTer2	Pres Comp Htz	5	DNA repair & Meiosis	Breast-ovarian cancer, familial / Fanconi Anemia
				NM_000059.4: c.9364G>A:p.A3122T		3	DNA repair & Meiosis	Breast-ovarian cancer, familial / Fanconi Anemia

282	European	SA (15)	ATM	NM_000051.4:c.8494C>T : p.Arg2832Cys	Pres Comp Htz	5	DNA repair & Meiosis	Ataxia Telangiectasia syndrome : Progressive cerebellar ataxia, telangiectasia, increased susceptibility to infections and higher risk of cancer
				NM_000051.4: c.6998C>A : p.Thr2333Lys		3	DNA repair & Meiosis	

PA: Primary amenorrhea; SA: secondary amenorrhea; Novel variants are in bold. Hom: homozygous; Het: heterozygous; Comp Het: Compound heterozygous; Pres Comp Het: Presumed compound heterozygous (parents not available); ACMG: Classification of variant according to American College of Medical Genetics and Genomics; P: Pathogenic, LP, Likely pathogenic. *Patients 9 and152 are sisters; Patients 300 and 301 are sisters; patients 247 and 255 are sisters; patients 43 and 44 are sisters.

Table S10: Patients with Pathogenic or Likely Pathogenic variants in more than one POI gene

ID	Ethnicity	Menses	Anomalie	ACMG	Status	Pathway
130	European	SA (20)	**TWNK(NM_021830.5) : c.904C>T : p.Arg302Trp**	4	Het	Mitochondria
			FANCM(NM_020937.4) : c.5791C>T : p.Arg1931Ter	5	Het	DNA repair & Meiosis
133	European	SA (38)	**POLG(NM_001126131.2): c.2492A>G: p.Tyr831Cys**	4	Het	Mitochondria
			PCCB (NM_000532.5) : c.911C>T : p.Thr304Ile	4	Het	Metabolism
138	Asian	SA (36)	**HFM1(NM_001017975.6): c.3470G>A: p.Cys1157Tyr**	5	Pres Comp Het*	DNA repair & Meiosis
			HFM1(NM_001017975.6): c.905G>A: p.Cys302Tyr	3		
			PCCA(NM_000282.4) : c.1168C>T : p.Arg390Cys	4	Het	Metabolism
167	European	SA (18)	**FANCM(NM_020937.4) : c.5101C>T :p.Gln1701Ter**	5	Comp Het*	DNA repair & Meiosis
			FANCM(NM_020937.4): c.1528G>A: p.Gly510Ser	3		
			ATM (NM_000051.4): c.6596_6597delCT: p.Ser2199Ter	5	Het	DNA repair & Meiosis
224	African	PA (16)	**TP63(NM_003722.5) : c.674T>C: p.Ile225Thr**	4	Het	DNA repair & Meiosis
			BLM (NM_000057.4) : c.772_773delCT : p.Leu258GlufsTer7	5	Het	DNA repair & Meiosis
232	Mixed	SP (30)	**AR(NM_000044.6) : c.2395C>G : p.Gln799Glu**	4	Het	Follicular growth
			FANCA (NM_000135.4): c.3558dupG: p.Arg1187GlufsTer28	5	Het	DNA repair & Meiosis
			BMPR1B(NM_001256793): c.1165A>G: p.Ser389Gly	4	Het	Follicular growth

268	North-African	SA (35)	PCCB (NM_000532): c.646A>G: p.Met216Val	4	Het	Metabolism

PA: Primary amenorrhea; SA: secondary amenorrhea; Het: heterozygous: Pres Comp Het: Presumed compound heterozygous (Parents not available); ACMG: Classification of variants according to the American College of Medical Genetics and Genomics; * parents not available**.** In bold the gene variant sufficient to cause POI

3.6 PIEGES D'INTERPRETATION DANS LA GENETIQUE DE L'INSUFFISANCE OVARIENNE PRIMITIVE

Article 6: Should FANCL heterozygous pathogenic variants be considered as potentially causative of primary ovarian insufficiency?

Abdelkader Heddar , Micheline Misrahi

Hum Mutat. 2020 Sep;41(9):1697-1699. doi: 10.1002/humu.24077

Article 7: Concerns regarding the potentially causal role of FANCA heterozygous variants in human primary ovarian insufficiency

Abdelkader Heddar , Micheline Misrahi

Hum Genet. 2021 Apr;140(4):691-694. doi: 10.1007/s00439-020-02232-5.

Article 8: Genetics of primary ovarian insufficiency: a careful step-by-step approach based on solid foundations to bring new knowledge

Abdelkader Heddar , Micheline Misrahi

Fertil Steril. 2022 Aug;118(2):421-424. doi: 10.1016/j.fertnstert.2022.05.024. Epub 2022 Jun 28

Concerns regarding the potentially causal role of FANCA heterozygous variants in human primary ovarian insufficiency
Hum Genet. 2021 Apr;140(4):691-694. doi: 10.1007/s00439-020-02232-5.

Should FANCL heterozygous pathogenic variants be considered as potentially causative of primary ovarian insufficiency?
Hum Mutat. 2020 Sep;41(9):1697-1699. doi: 10.1002/humu.24077

Les gènes impliqués dans l'IOP connus à ce jour sont de transmission autosomique dominante, récessive ou liée à l'X (Huhtaniemi *et al.*, 2018a). La prépondérance d'une héritabilité maternelle dominante dans l'IOP, suggérée initialement par les formes familiales, a été confirmée initialement par les premiers gènes identifiés dans l'IOP essentiellement par des stratégies de gène candidat (comme *FOXL2* dans le BPES, *BMP15*, *NR5A1*...) (Cramer *et al.*, 1995; Stolk *et al.*, 2012; Rossetti *et al.*, 2017; Huhtaniemi *et al.*, 2018a). Paradoxalement, l'application des techniques d'exome a révélé en effet que la majorité des gènes identifiés à ce jour depuis ces 10 dernières années, sont de transmission autosomique récessive (Huhtaniemi *et al.*, 2018a; Heddar and Misrahi, 2021). Concernant les gènes de réparation de l'ADN, uniquement deux gènes, *ERCC6* et *BNC1* ont été identifiés dans deux grandes familles d'origine chinoise dont la transmission autosomique dominante a été confirmée par la ségrégation du variant identifié (Qin *et al.*, 2015a; Zhang *et al.*, 2018a). L'effet dominant négatif des variants identifiés du gène *ERCC6* ou l'haplo-insuffisance de *BNC1* soutenu par les données du modèle murin ou des tests *in vitro* ont été suggérés (Qin *et al.*, 2015a; Zhang *et al.*, 2018a). Dans ces 3 lettres à l'éditeur que nous avons publiées, nous discutons quelques pièges d'interprétation des variants génétiques dans l'IOP de trois études publiées récemment.

Début 2020, deux publications rapportent un lien de causalité entre des variants hétérozygotes de deux gènes de la voie Fanconi (*FANCA et FANCL*) et l'IOP chez quatre patientes non apparentées d'origine chinoise (Yang *et al.*, 2019b, 2020). L'effet fonctionnel de ces variants (2 variants faux-sens de *FANCA* et 2 variants tronquants de *FANCL*) a été étudié *in vitro* mais aucune étude de transmission n'a été effectué (Yang *et al.*, 2019b, 2020). Nous avons émis des doutes sur l'implication des variants hétérozygotes de ces deux gènes dans l'IOP chez la femme (Heddar and Misrahi, 2020, 2021).

L'anémie de Fanconi est un syndrome génétique rare caractérisée par une insuffisance médullaire, des malformations multiples et une fragilité chromosomique élevée avec un risque accru de cancer et souvent le décès dans les premières années de vie ou avant la puberté (Auerbach, 2009). Sur le plan génétique, la transmission est majoritairement autosomique récessive pour les gènes de la voie Fanconi (Auerbach, 2009) à l'exception de *FANCB* transmis selon un mode récessif lié à l'X (Meetei *et al.*, 2004) et deux mutations *de novo* de RAD51 avec effet dominant négatif démontré (Ameziane et al., 2015 ; Wang et al., 2015). L'utilisation du séquençage de l'exome chez les patients infertiles dans les deux sexes a permis de mettre en évidence l'implication, par l'identification de variants bi-alléliques, de plusieurs gènes de l'AF (Huhtaniemi *et al.*, 2018a). Sur le plan phénotypique, ces patients adultes infertiles correspondent soit à une anémie de Fanconi ayant survécu à l'âge adulte (Weinberg-Shukron *et al.*, 2018; Turchetti *et al.*, 2019), soit à une infertilité apparemment isolée chez des hommes présentant une anomalie hématologique mineure notamment avec des mutations homozygotes de *FANCA* (Krausz *et al.*, 2019), soit à une infertilité isolée sans cancer ni de signe d'AF à la fois chez l'homme

et la femme : *FANCM* (Fouquet *et al.*, 2017a; Kasak *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 2019; Heddar *et al.*, 2022b), *FANCD1* (*BRCA2*) (Caburet *et al.*, 2020a; Heddar *et al.*, 2022b) ou *FANCU* (*XRCC2*) (Zhang *et al.*, 2019b).

Donc*, FANCA* et *FANCL* sont deux gènes de la voie de Fanoni impliqués dans des formes récessives de l'AF pouvant se manifester, pour *FANCA* par une infertilité masculine et des anomalies hématologique minimes. De plus, et alors que *FANCA* est le gène le plus souvent muté dans l'AF (chez 60 à 80 % des patients atteints d'AF) (Bogliolo *et al.*, 2020) avec plus de 509 variants pathogènes décrits (http://www2.rockefeller.edu/fanconi/), Les mutations bi-alléliques de *FANCL* sont extrêmement rares (0.2%) mais responsables de formes particulièrement sévères de révélation très précoce et aucune forme chez l'adulte n 'a été décrite à ce jour (Neveling *et al.*, 2009; Donovan *et al.*, 2020). Dans tous les cas liés aux variants pathogènes bi alléliques de *FANCA* ou de *FANCL,* et ce quel que soit le type de variant, aucune infertilité n'a été rapportée chez les parents hétérozygotes ou les porteurs obligatoires. Par exemple, dans une grande famille chinoise décrite sur trois générations, toutes les femmes - du moins les porteuses obligatoires d'un variant tronquant de *FANCL* (c.822_823insCTTTCAGG;p.Asp275LeufsX13) - ont eu des grossesses et n'ont pas développé d'IOP ou de ménopause précoce (Wu *et al.*, 2017).

D'autre part, on sait qu'il existe une fréquence élevée des porteurs hétérozygotes de variants pathogènes des gènes de l'anémie de Fanconi (dont des altérations moléculaires majeures), jusqu'à 1/200 (Auerbach, 2009; Taylor *et al.*, 2019). Si les variants pathogènes hétérozygotes de ces gènes sont à l'origine d'une IOP, ils seront responsables de la moitié des causes de cette pathologie qui a une fréquence d'environ 1/100 chez les femmes de moins de 40 ans (Huhtaniemi *et al.*,

2018a).

Il n’existe donc pas suffisamment de preuves pour établir un lien de causalité entre les variants hétérozygotes pathogènes des gènes de la voie de Fanconi notamment *FANCA* et *FANCL* et l’IOP. L’étude de grandes cohortes de patientes et la comparaison avec une population témoin contrôle bien caractérisée sur le plan de la fertilité ainsi que les études de ségrégation dans des grandes familles seront nécessaires pour conclure.

Human Genetics (2021) 140:691–694
https://doi.org/10.1007/s00439-020-02232-5

LETTER TO THE EDITOR

Concerns regarding the potentially causal role of *FANCA* heterozygous variants in human primary ovarian insufficiency

Abdelkader Heddar[1,2] · Micheline Misrahi[1,2]

Received: 19 May 2020 / Accepted: 20 October 2020 / Published online: 5 November 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

To the Editor,

We have read with interest the recent article by Yang et al (2019) that reported two novel *FANCA* heterozygous variants: c.1772G > A (p.Arg591Gln) and c.3887A > G (p.Glu1296Gly) causing primary ovarian insufficiency (POI) in two unrelated Chinese patients with primary or secondary amenorrhea at the age of 24 years (Yang et al. 2019). No familial segregation studies were performed and we have other several key concerns about a possible causal link between such *FANCA* heterozygous variants and POI in humans.

Fanconi anemia (FA) is a rare and severe life-threatening condition with pancytopenia, multiple malformations and increased risk of malignancies (Auerbach 2009). Patients with FA who have survived to adulthood often develop infertility in both sexes (Giri et al. 2007). However, more surprisingly, recent whole-exome sequencing studies, performed in infertile adults, have highlighted DNA repair or meiosis genes as a major genetic family involved in POI (Table 1). Notably, bi-allelic variants of several FA genes cause isolated POI in women and isolated male infertility as for *FANCM* (Fouquet et al. 2017; Kasak et al. 2018; Yin et al. 2019), *FANCU* (Yang et al. 2018) and *FANCD2 (BRCA2)* (Caburet et al. 2019, 2020). In other cases, the phenotypes of these adult patients corresponded to mild FA-like phenotypes (Weinberg-Shukron et al. 2018; Krausz et al. 2019; Turchetti et al. 2019). Notably infertile male patients with bi-allelic *FANCA* pathogenic variants have minor hematological defects and/or other FA traits like mild dysmorphic features, short stature or café au lait spots (Krausz et al. 2019). The mode of transmission is autosomal recessive for most of the meiosis or DNA repair genes (13 out of 16) and notably genes of the Fanconi Anemia pathway (Table 1). For only 2 meiosis or DNA repair genes, a dominant inheritance has been formally demonstrated by familial segregation and also functional in vitro studies (Qin et al. 2015; Zhang et al. 2018). Remarkably, in all these families described worldwide with bi-allelic pathogenic variants of a FA gene, heterozygous carriers (mother or father) were fertile, highlighting the absence of haploinsufficiency even for families with major molecular defects.

FANCA is the most commonly mutated gene in FA (60–80% of patients with FA) (Bogliolo et al. 2020). Five-hundred-and-nine (509) pathogenic or likely pathogenic variants, predominantly truncating, have been reported in the FA database (https://www2.rockefeller.edu/fanconi/). Again, no POI or early menopause has been reported in heterozygous siblings of these families. In addition, contrary to what Yang et al (2019) reported, the p.Arg591Gln variant is not rare for a presupposed dominant variant. First, its Minor Allele Frequency (MAF) of 0.00179 (33/18.390 allele) in the East Asian population (to which the patients belong) in the gnomAD exome database exceeds the lower limit (10^{-4}) described for dominant variants (Richards et al. 2015). Second, this variant has also been reported in the gnomAD genome database, also exclusively in the East Asian population (MAF of 0.00128 = 4/3.134 alleles). Indeed this variant is relatively frequent in this population, too frequent to be considered pathogenic when heterozygous. This variant allele very probably corresponds to a founder allele in the East Asian population.

Furthermore, POI is a heterogeneous syndrome that affects 1% of women under 40 years and 1 ‰ before 30 years (Huhtaniemi et al. 2018). The latter prevalence roughly corresponds to the MAF of the p.Arg591Gln variant allele detected in one of the two Chinese patient aged

✉ Micheline Misrahi
micheline.misrahi@aphp.fr

1 Faculté de Médecine; Unité de Génétique Moléculaire Des Maladies Métaboliques Et de La Reproduction, APHP Hôpitaux Universitaires Paris-Saclay, Université Paris Saclay, Hôpital Bicêtre, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France

2 Université Paris Saclay, UMR-S 1193, INSERM, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

Table 1 Meiosis or DNA repair genes causing POI

Gene	Transmission	Amenorrhea	Pregnancy	Associated signs	References
PSMC3IP	Recessive	PA	No	None	Zangen et al. (2011)
HFM1	Recessive	SA	Yes	None	Wang et al. (2014)
MCM9	Recessive	PA	No	Short stature, hypothyroidim	Wood-Trageser et al. (2014)
STAG3	Recessive	PA	No	None	Caburet et al. (2014)
SYCE1	Recessive	PA	No	Bilateral nanophthalmos, macular dystrophy	de Vries et al. (2014)
CSB-PGBD3	Dominant	SA	Yes	None	Qin et al. (2015)
MCM8	Recessive	PA	No	Hypothyroidism	AlAsiri et al. (2015)
	Recessive	PA	No	Short stature, pilomatricomas	Heddar et al. (2020)
FANCM	Recessive	SA	Yes	None	Fouquet et al. (2017)
MSH4	Recessive	P-SA	No	None	Carlosama et al. (2017)
MSH5	Recessive	SA	No	None	Guo et al. (2017)
SPIDR	Recessive	PA	No	None	Smirin-Yosef et al . (2017)
BNC1	Dominant	SA	Yes	None	Zhang et al. (2018)
WDR62	Dominant	SA	No	None	Zhou et al. (2018)
FANCU	Recessive	PA	No	None	Yang et al. (2018)
BRCA2	Recessive	PA	No	Fanconi anemia	Weinberg-Shukron et al. (2018)
	Recessive	P-SA	No	None	Caburet et al. (2020)
MEIOB	Recessive	PA	No	None	Caburet et al. (2019)

PA Primary amenorrhea, *SA* secondary amenorrhea, P-SA: Primo-secondary amenorrhea

24 years (0.00179 and 0.00128) making very unlikely that most POI under thirty could be due to this single-variant allele. More generally, it is known that there is a high frequency of heterozygous carriers of FA genes pathogenic variants, especially for *FANCA*, up to 0.5% (Auerbach 2009). If the heterozygous pathogenic variants of these genes caused POI, they will be responsible for half of the POI (Huhtaniemi et al. 2018).

It should be emphasized that intragenic deletions, either homozygous or compound heterozygous with a pathogenic FA variant, frequently occur in FA genes, especially in *FANCA*. In several studies, up to 15–60% deletions are detected in patients with FA (Morgan et al. 1999; Tipping et al. 2001; Castella et al. 2011). Recently, copy number variation (CNV) detection based on exome data revealed 22 deletions in *FANCA* (32%) in 68 patients with FA (Bogliolo et al. 2020). In the absence of CNV studies by Yang et al., the causal role of the FANCA heterozygous variants alone in POI cannot be established.

Functional in vitro studies showed a slight diminution of FANCD2 ubiquitination by FANCA mutants (Arg591Gln and p.Glu1296Gly) compared to WT (Ratio of ubiquitinated-FANCD2/FANCD2 ~ 5 for the WT and ~ 4 for the two FANCA mutants). It is, therefore, not possible to conclude that this very partial in vitro effect could yield to an in vivo haploinsufficiency in humans. Rodent models have been established. First, they do not carry the same molecular defect observed in the patients, and second, the physiology is known to differ between rodent and humans and care should be taken when conclusions are derived from rodent models. Such models can support human data but certainly not contradict them.

The study of DNA repair-deficient knockout mouse models and in vitro assays suggest that oocytes are equipped to execute the repair of a wide variety of DNA lesions (Stringer et al. 2018, 2020). The pathogenic role of heterozygous variants of other meiosis or DNA repair genes in POI, such as *ERCC6* or *BNC1*, has been established by both familial segregation and functional studies that demonstrate a dominant negative effect or haploinsufficiency (Qin et al. 2015; Zhang et al. 2018). For *BRCA1/2*, one of the FA genes, the findings are contradictory. Some studies report a decreased ovarian reserve in heterozygous *BRCA1/2* carriers, while others have not detected a link between such variants and fertility and other studies describe increased fertility in heterozygous *BRCA1/2* carriers (Daum et al. 2018). However, the nature of the *BRCA1/2* variants (missense, truncation), which may potentially alter the function of BRCA1/2 differently, was not taken into account in these different studies.

It remains possible that such heterozygous variants of meiosis and DNA repair genes may have a moderate effect and, if they alone are not sufficient to impair fertility in women, genetic or environmental factors could play an additive role. Interestingly, we recently showed that a truncating variant of *MCM8*, another DNA repair gene, causes POI with primary amenorrhea when it is homozygous in the

daughter, but POI with secondary amenorrhea when it is heterozygous in the mother in the presence of an additional factor (i. e. autoimmunity) (Heddar et al. 2020).

In summary, there is no evidence to date to establish a causal link between the heterozygous variants of *FANCA* and POI. Case–control studies or particularly the segregation of heterozygous variants of FA genes in large families is needed to draw such conclusions.

Compliance with ethical standards

Conflict of interests The authors declare no conflict of interest.

References

AlAsiri S, Basit S, Wood-Trageser MA, Yatsenko SA, Jeffries EP, Surti U, Ketterer DM, Afzal S, Ramzan K, Faiyaz-Ul Haque M, Jiang H, Trakselis MA, Rajkovic A (2015) Exome sequencing reveals MCM8 mutation underlies ovarian failure and chromosomal instability. J Clin Invest 125(1):258–262. https://doi.org/10.1172/JCI78473

Auerbach AD (2009) Fanconi anemia and its diagnosis. Mutat Res 668:4–10. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.01.013

Bogliolo M, Pujol R, Aza-Carmona M et al (2020) Optimised molecular genetic diagnostics of Fanconi anaemia by whole exome sequencing and functional studies. J Med Genet 57:258–268. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106249

Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, Harrison W, Vaiman D, Ben-Neriah Z, García-Tuñón I, Fellous M, Pendás AM, Veitia RA, Vilain E (2014) Mutant Cohesin in Premature Ovarian Failure. N Engl J Med 370(10):943–949. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1309635

Caburet S, Todeschini A-L, Petrillo C, Martini E, Farran ND, Legois B, Livera G, Younis JS, Shalev S, Veitia RA (2019) A truncating MEIOB mutation responsible for familial primary ovarian insufficiency abolishes its interaction with its partner SPATA22 and their recruitment to DNA double-strand breaks. EBioMedicine 42:524–531. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.075

Caburet S, Heddar A, Dardillac E et al (2020) Homozygous hypomorphic BRCA2 variant in primary ovarian insufficiency without cancer or Fanconi anaemia trait. J Med Genet. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106672

Carlosama C, Elzaiat M, Patiño LC, Mateus HE, Veitia RA, Laissue P (2017) A homozygous donor splice-site mutation in the meiotic gene MSH4 causes primary ovarian insufficiency. Hum Mol Genet 26:3161–3166. https://doi.org/10.1093/hmg/ddx199

Castella M, Pujol R, Callén E et al (2011) Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations. Blood 117:3759–3769. https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-299917

Daum H, Peretz T, Laufer N (2018) BRCA mutations and reproduction. Fertil Steril 109:33–38. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.12.004

de Vries L, Behar DM, Smirin-Yosef P, Lagovsky I, Tzur S, Basel-Vanagaite L (2014) Exome sequencing reveals sycel mutation associated with autosomal recessive primary ovarian insufficiency. J Clin Endocrinol Metab 99(10):E2129–E2132. https://doi.org/10.1210/jc.2014-1268

Fouquet B, Pawlikowska P, Caburet S, et al (2017) A homozygous FANCM mutation underlies a familial case of non-syndromic primary ovarian insufficiency. Elife 6:. https://doi.org/10.7554/eLife.30490

Giri N, Batista DL, Alter BP, Stratakis CA (2007) Endocrine abnormalities in patients with Fanconi anemia. J Clin Endocrinol Metab 92:2624–2631. https://doi.org/10.1210/jc.2007-0135

Guo T, Zhao S, Zhao S, Chen M, Li G, Jiao X, Wang Z, Zhao Y, Qin Y, Gao F, Chen Z-J (2017) Mutations in MSH5 in primary ovarian insufficiency. Hum Mol Genet 26(8):1452–1457. https://doi.org/10.1093/hmg/ddx044

Heddar A, Beckers D, Fouquet B et al (2020) A novel phenotype combining primary ovarian insufficiency growth retardation and pilomatricomas with MCM8 mutation. J Clin Endocrinol Metab. https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa155

Huhtaniemi I, Hovatta O, La Marca A et al (2018) Advances in the molecular pathophysiology, genetics, and treatment of primary ovarian insufficiency. Trends Endocrinol Metab 29:400–419. https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.03.010

Kasak L, Punab M, Nagirnaja L et al (2018) Bi-allelic recessive loss-of-function variants in FANCM cause non-obstructive azoospermia. Am J Hum Genet 103:200–212. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.07.005

Krausz C, Riera-Escamilla A, Chianese C et al (2019) From exome analysis in idiopathic azoospermia to the identification of a high-risk subgroup for occult Fanconi anemia. Genet Med 21:189–194. https://doi.org/10.1038/s41436-018-0037-1

Morgan NV, Tipping AJ, Joenje H, Mathew CG (1999) High frequency of large intragenic deletions in the Fanconi anemia group A gene. Am J Hum Genet 65:1330–1341. https://doi.org/10.1086/302627

Qin Y, Guo T, Li G et al (2015) CSB-PGBD3 Mutations cause premature ovarian failure. PLoS Genet 11:e1005419. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005419

Richards S, Aziz N, Bale S et al (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American college of medical genetics and genomics and the association for molecular pathology. Genet Med 17:405–424. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30

Smirin-Yosef P, Zuckerman-Levin N, Tzur S, Granot Y, Cohen L, Sachsenweger J, Borck G, Lagovsky I, Salmon-Divon M, Wiesmüller L, Basel-Vanagaite L (2017) A biallelic mutation in the homologous recombination repair gene SPIDR is associated with human gonadal dysgenesis. J Clin Endocrinol Metab 102(2):681–688. https://doi.org/10.1210/jc.2016-2714

Stringer JM, Winship A, Liew SH, Hutt K (2018) The capacity of oocytes for DNA repair. Cell Mol Life Sci 75:2777–2792. https://doi.org/10.1007/s00018-018-2833-9

Stringer JM, Winship A, Zerafa N et al (2020) Oocytes can efficiently repair DNA double-strand breaks to restore genetic integrity and protect offspring health. Proc Natl Acad Sci USA 117:11513–11522. https://doi.org/10.1073/pnas.2001124117

Tipping AJ, Pearson T, Morgan NV et al (2001) Molecular and genealogical evidence for a founder effect in Fanconi anemia families of the Afrikaner population of South Africa. Proc Natl Acad Sci USA 98:5734–5739. https://doi.org/10.1073/pnas.091402398

Turchetti D, Zuntini R, Tricarico R (2019) BRCA2 in Ovarian development and function. N Engl J Med 380:1086–1087. https://doi.org/10.1056/NEJMc1813800

Wang J, Zhang W, Jiang H, Wu B-L (2014) Mutations in in recessive primary ovarian insufficiency. N Engl J Med 370(10):972–974. https://doi.org/10.1056/NEJMc1310150

Weinberg-Shukron A, Rachmiel M, Renbaum P et al (2018) Essential role of BRCA2 in Ovarian development and function. N Engl J Med 379:1042–1049. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800024

Wood-Trageser MA, Gurbuz F, Yatsenko SA, Jeffries EP, Kotan LD, Surti U, Ketterer DM, Matic J, Chipkin J, Jiang H, Trakselis MA, Topaloglu AK, Rajkovic A (2014) MCM9 mutations are associated with ovarian failure, short stature, and chromosomal

instability. Am J Hum Genet 95(6):754–762. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.11.002

Yang X, Zhang X, Jiao J et al (2019) Rare variants in FANCA induce premature ovarian insufficiency. Hum Genet 138:1227–1236. https://doi.org/10.1007/s00439-019-02059-9

Yang Y, Guo J, Dai L et al (2018) XRCC2 mutation causes meiotic arrest, azoospermia and infertility. J Med Genet 55:628–636. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-105145

Yin H, Ma H, Hussain S et al (2019) A homozygous FANCM frameshift pathogenic variant causes male infertility. Genet Med 21:62–70. https://doi.org/10.1038/s41436-018-0015-7

Zangen D, Kaufman Y, Zeligson S, Perlberg S, Fridman H, Kanaan M, Abdulhadi-Atwan M, Abu Libdeh A, Gussow A, Kisslov I, Carmel L, Renbaum P, Levy-Lahad E (2011) XX ovarian dysgenesis is caused by a PSMC3IP/HOP2 mutation that abolishes coactivation of estrogen-driven transcription. Am J Hum Genet 89(4):572–579. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.09.006

Zhang D, Liu Y, Zhang Z et al (2018) Basonuclin 1 deficiency is a cause of primary ovarian insufficiency. Hum Mol Genet 27:3787–3800. https://doi.org/10.1093/hmg/ddy261

Zhou Y, Qin Y, Qin Y, Xu B, Guo T, Ke H, Chen M, Zhang L, Han F, Li Y, Chen M, Behrens A, Wang Y, Xu Z, Chen Z-J, Gao F, Bowles J (2018) Wdr62 is involved in female meiotic initiation via activating JNK signaling and associated with POI in humans. PLOS Genet 14(8):e1007463. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007463

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Check for up

DOI: 10.1002/humu.24077

LETTER TO THE EDITOR

Human Mutation HGVS HUMAN GENOME VARIATION SOCIETY WILEY

Should *FANCL* heterozygous pathogenic variants be considered as potentially causative of primary ovarian insufficiency?

To the Editor,

At the beginning of 2020, we were surprised by a publication in this journal that reported two novel *FANCL* heterozygous frameshift variants (c.1048_1051delGTCT [p.Gln350Valfs*18] and c.739dupA [p.Met247Asnfs*4]) potentially causing primary ovarian insufficiency (POI) in two Chinese patients (Yang et al., 2020). Even if in vitro functional studies of these heterozygous variants suggest (as stated by the authors) but do not demonstrate, haploinsufficiency, no family transmission studies were performed and we have other main concerns about a possible existence of FANCL haploinsufficiency in POI.

Fanconi anemia (FA) is a rare, mostly recessive genetic syndrome, that is usually associated with various developmental defects, genetic instability, bone marrow failure, and an increased risk of cancer with often early death before puberty (Auerbach, 2009). Infertility in adult patients of both sexes is common. It is mainly secondary to biallelic pathogenic variants in one of the 20 known FA genes, which play a major role in homologous recombination and DNA repair (Mehta & Tolar, 1993). The only two exceptions to this recessive mode of transmission correspond to two de novo dominant-negative *RAD51 (FANCR)* variants (Ameziane et al., 2015; Wang et al., 2015), and a highly rare, hemizygous variant of the *FANCB* gene, the only gene known to cause X-linked FA (Meetei et al., 2004). Given the major role of these genes in homologous recombination not only in somatic cells but also in germinal cells, the wide use of next-generation sequencing in infertile adults has unsurprisingly highlighted bi-allelic variants of several FA genes as a genetic cause of infertility in both men and women, notably POI. Phenotypically, these infertile adult patients harboring biallelic variants of *FA* genes correspond to FA surviving into adulthood (Weinberg-Shukron et al., 2018), moderate forms of FA (Turchetti, Zuntini, & Tricarico, 2019), notably with isolated minor hematological abnormalities in patients with *FANCA* defects (Krausz et al., 2019), but also very surprisingly in isolated POI without cancer or FA trait for molecular defects of *FANCM* (Fouquet et al., 2017; Kasak et al., 2018; Yin et al., 2019) or even in *FANCD1 (BRCA2)* a major breast cancer susceptibility gene (Caburet et al., 2019; Caburet et al., 2020).

In FA, *FANCL* is the least commonly mutated gene and represents 0.2% of all FA reported to date (Neveling, Endt, Hoehn, & Schindler, 2009). *FANCL* is responsible for extremely severe forms of FA, with 21 patients reported to date, and no adult form described (Donovan et al., 2020). In all the cases related to biallelic *FANCL* pathogenic variants (including most often truncating or nonsense variants), no infertility has been reported in the heterozygous parents or the obligate carriers. In particular, in a large Chinese family described in three generations, all women—at least the obligate carriers of the *FANCL* frameshift variant (c.822_823insCTTTCAGG; p.Asp275LeufsX13)—had pregnancies and did not develop POI or premature menopause (Wu et al., 2017). Very recently, a synonymous *FANCL* variation (NM_018062.3:c.1092G>A; p.Lys364=) involving the last nucleotide position of exon 13 was identified in 13 young patients (from 3 to 10 years at diagnosis) from unrelated south Asian families (Donovan et al., 2020). This variant was shown to induce aberrant mRNA splicing (c.1021_1092del) yielding a protein lacking 24 amino acids of the FANCL RING domain. This allele present only in the South Asian population, has a frequency of 1.99×10^{-5} in the gnomAD exome database. It corresponds to a founder allele in this Asian population but it is not responsible for POI at the heterozygous state. When homozygous, this variant causes classical forms of FA.

To date, dominant-negative effect or haploinsufficiency have not been demonstrated for other FANC genes except for RAD51 in two young children presenting an FA-like phenotype (Ameziane et al., 2015; Wang et al., 2015) and the expectional X-linked FA related to *FANCB* pathogenic variants (Meetei et al., 2004).

Furthermore, intragenic homozygous deletions or compound heterozygous deletions associated with an additive pathogenic FA variant, are common with a rate of up to 15–60% in various ethnic groups (Castella et al., 2011; Morgan, Tipping, Joenje, & Mathew, 1999; Tipping et al., 2001). In a recent publication, 23 deletions (22 in *FANCA*, 1 in *FANCT* and 1 in *FANCD2*) were reported in 68 patients with FA (34%) using copy number variation (CNV) detection based on exome data (Bogliolo et al., 2020). In the absence of CNV screening (based on exome data or another method such as comparative genomic hybridization array or multiplex ligation-dependent probe amplification), the causal role of heterozygous variants of *FANCL* alone in POI cannot be determined. POI in these patients could also be due to an associated molecular defect of an unknown gene.

It is known that there is a high frequency of heterozygous carriers of FA genes pathogenic variants (including major molecular alterations), up to 1/200 (Auerbach, 2009). If heterozygous pathogenic

 © 2020 Wiley Periodicals LLC

variants of these genes caused POI, they will be responsible for half of the POI cases. Indeed, the frequency of this condition is approximately 1/100 in women under 40 years (Huhtaniemi et al., 2018).

Finally, *BRCA1/2*, one of the FA genes, is one of the genes for which the impact of haploinsufficiency on fertility in women has been widely studied. Different studies are contradictory, ranging from reports of a decreased ovarian reserve—and thus subfertility—in heterozygous *BRCA1/2* carriers to reports of no link between heterozygous *BRCA1/2* variants and fertility or even studies reporting increased fertility in heterozygous *BRCA1/2* carriers (Daum, Peretz, & Laufer, 2018). A possible explanation for these contradictory results is that these heterozygous variants alone are not sufficient to impair fertility in women. Additive factors might be involved. Indeed, we have shown that a truncating variant of another DNA repair gene, *MCM8*, uncovered in a consanguineous family by whole-exome sequencing, yielded POI with primary amenorrhea when homozygous in the daughter; but POI with secondary amenorrhea when heterozygous in the mother in the presence of additional factors (autoimmunity; Heddar, Beckers, Fouquet, Roland, & Misrahi, 2020). Furthermore, such BRCA1/2 studies have not taken into account the nature of *BRCA1/2* variants (missense, truncation), which may impair differently BRCA1/2 protein function.

In summary, there is insufficient evidence to establish a direct causal link between the heterozygous variants of *FANCL* and POI in the absence of large case-control studies or the segregation of these heterozygous FA variants in large families. Such segregation studies have been performed for variants of *BNC1* and *ERCC6* which are other POI genes implicated in DNA repair with an autosomal dominant mode of transmission (Qin et al., 2015; Zhang et al., 2018).

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

Abdelkader Heddar[1,2]
Micheline Misrahi[1,2]

[1]*Unité de Génétique Moléculaire des Maladies Métaboliques et de la Reproduction, APHP Hôpitaux Universitaires Paris-Saclay, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France*
[2]*UMR-S 1193, INSERM, Université Paris Saclay, AP-HP, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France*

Correspondence
Micheline Misrahi, Unité de Génétique Moléculaire des Maladies Métaboliques et de la Reproduction, APHP Hôpitaux Universitaires Paris-Saclay, Hôpital Bicêtre, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France.
Email: micheline.misrahi@aphp.fr

ORCID

Abdelkader Heddar http://orcid.org/0000-0002-1966-5462
Micheline Misrahi http://orcid.org/0000-0002-5379-8859

REFERENCES

Ameziane, N., May, P., Haitjema, A., van de Vrugt, H. J., van Rossum-Fikkert, S. E., Ristic, D., … Dorsman, J. C. (2015). A novel Fanconi anaemia subtype associated with a dominant-negative mutation in RAD51. *Nature Communications*, *6*, 8829.

Auerbach, A. D. (2009). Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutation Research/DNA Repair*, *668*, 4–10.

Bogliolo, M., Pujol, R., Aza-Carmona, M., Muñoz-Subirana, N., Rodriguez-Santiago, B., Casado, J. A., … Surralles, J. (2020). Optimised molecular genetic diagnostics of Fanconi anaemia by whole exome sequencing and functional studies. *Journal of Medical Genetics*, *57*, 258–268.

Caburet, S., Heddar, A., Dardillac, E., Creux, H., Lambert, M., Messiaen, S., … Misrahi, M. (2019). A homozygous hypomorphic BRCA2 variant causes primary ovarian insufficiency without cancer or Fanconi anemia traits. *bioRxiv*. https://doi.org/10.1101/751644

Caburet, S., Heddar, A., Dardillac, E., Creux, H., Lambert, M., Messiaen, S., … Misrahi, M. (2020). Homozygous hypomorphic BRCA2 variant in primary ovarian insufficiency without cancer or Fanconi anaemia trait. *Journal of Medical Genetics*. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106672

Castella, M., Pujol, R., Callén, E., Trujillo, J. P., Casado, J. A., Gille, H., … Surrallés, J. (2011). Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations. *Blood*, *117*, 3759–3769.

Daum, H., Peretz, T., & Laufer, N. (2018). BRCA mutations and reproduction. *Fertility and Sterility*, *109*, 33–38.

Donovan, F. X., Solanki, A., Mori, M., Chavan, N., George, M., C, S. K., … Vundinti, B. R. (2020). A founder variant in the South Asian population leads to a high prevalence of FANCL Fanconi anemia cases in India. *Human Mutation*, *41*, 122–128.

Fouquet, B., Pawlikowska, P., Caburet, S., Guigon, C., Mäkinen, M., Tanner, L., … Misrahi, M. (2017). A homozygous FANCM mutation underlies a familial case of non-syndromic primary ovarian insufficiency. *eLife*, *6*, 6.

Heddar, A., Beckers, D., Fouquet, B., Roland, D., & Misrahi, M. (2020). A novel phenotype combining primary ovarian insufficiency growth retardation and pilomatricomas with MCM8 mutation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *105*(6), dgaa155.

Huhtaniemi, I., Hovatta, O., La Marca, A., Livera, G., Monniaux, D., Persani, L., … Misrahi, M. (2018). Advances in the molecular pathophysiology, genetics, and treatment of primary ovarian insufficiency. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *29*, 400–419.

Kasak, L., Punab, M., Nagirnaja, L., Grigorova, M., Minajeva, A., Lopes, A. M., … Laan, M. (2018). Bi-allelic recessive loss-of-function variants in FANCM cause non-obstructive azoospermia. *American Journal of Human Genetics*, *103*, 200–212.

Krausz, C., Riera-Escamilla, A., Chianese, C., Moreno-Mendoza, D., Ars, E., Rajmil, O., … Surrallés, J. (2019). From exome analysis in idiopathic azoospermia to the identification of a high-risk subgroup for occult Fanconi anemia. *Genetics in Medicine*, *21*, 189–194.

Meetei, A. R., Levitus, M., Xue, Y., Medhurst, A. L., Zwaan, M., Ling, C., … Joenje, H. (2004). X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nature Genetics*, *36*, 1219–1224.

Mehta, P. A., & Tolar, J. (1993). Fanconi Anemia. In M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. Stephens & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews®*. Seattle, WA: University of Washington, Seattle.

Morgan, N. V., Tipping, A. J., Joenje, H., & Mathew, C. G. (1999). High frequency of large intragenic deletions in the Fanconi anemia group A gene. *American Journal of Human Genetics*, *65*, 1330–1341.

Neveling, K., Endt, D., Hoehn, H., & Schindler, D. (2009). Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia. *Mutation Research/DNA Repair*, *668*, 73–91.

Qin, Y., Guo, T., Li, G., Tang, T.-S., Zhao, S., Jiao, X., … Chen, Z.-J. (2015). CSB-PGBD3 mutations cause premature ovarian failure. *PLOS Genetics*, *11*, e1005419.

Tipping, A. J., Pearson, T., Morgan, N. V., Gibson, R. A., Kuyt, L. P., Havenga, C., … Mathew, C. G. (2001). Molecular and genealogical

evidence for a founder effect in Fanconi anemia families of the Afrikaner population of South Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*, 5734–5739.

Turchetti, D., Zuntini, R., & Tricarico, R. (2019). BRCA2 in ovarian development and function. *New England Journal of Medicine*, *380*, 1086–1087.

Wang, A. T., Kim, T., Wagner, J. E., Conti, B. A., Lach, F. P., Huang, A. L., … Smogorzewska, A. (2015). A dominant mutation in human RAD51 reveals its function in DNA interstrand crosslink repair independent of homologous recombination. *Molecular Cell*, *59*, 478–490.

Weinberg-Shukron, A., Rachmiel, M., Renbaum, P., Gulsuner, S., Walsh, T., Lobel, O., … Zangen, D. (2018). Essential role of BRCA2 in ovarian development and function. *New England Journal of Medicine*, *379*, 1042–1049.

Wu, W., Liu, Y., Zhou, Q., Wang, Q., Luo, F., Xu, Z., … Xie, J. (2017). Novel homozygous FANCL mutation and somatic heterozygous SETBP1 mutation in a Chinese girl with Fanconi anemia. *European Journal of Medical Genetics*, *60*, 369–373.

Yang, Y., Guo, T., Liu, R., Ke, H., Xu, W., Zhao, S., & Qin, Y. (2020). FANCL gene mutations in premature ovarian insufficiency. *Human Mutations*, *41*, pp. 1033–1041. Retrieved from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.23997

Yin, H., Ma, H., Hussain, S., Zhang, H., Xie, X., Jiang, L., … Shi, Q. (2019). A homozygous FANCM frameshift pathogenic variant causes male infertility. *Genetics in Medicine*, *21*, 62–70.

Zhang, D., Liu, Y., Zhang, Z., Lv, P., Liu, Y., Li, J., … Huang, H. (2018). Basonuclin 1 deficiency is a cause of primary ovarian insufficiency. *Human Molecular Genetics*, *27*, 3787–3800.

Genetics of primary ovarian insufficiency: a careful step-by-step approach based on solid foundations to bring new knowledge.
Fertil Steril. 2022 Aug;118(2):421-424. doi: 10.1016/j.fertnstert.2022.05.024.

Dans cette étude publiée en 2022, Rouen et ses collègues ont rapporté les résultats de l'étude d'exome d'une cohorte de 36 formes familiales d'IOP et ont estimé un rendement diagnostique de 50% (Rouen *et al.*, 2022). Nous avons émis des réserves sur les résultats de cette étude (Heddar and Misrahi, 2022).

Premièrement, contrairement au titre de cette publication « *Whole exome sequencing in a cohort of familial premature ovarian insufficiency cases reveals a broad array of pathogenic or likely pathogenic variants in 50% of families* », la moitié de cette cohorte correspondant à des formes sporadiques. L'exome de chaque patiente a été étudié d'une façon isolée sans comparaison avec l'exome des autres membres de la famille (atteinte ou non) vraisemblablement indisponible. La non-détermination *a priori* du mode de transmission le plus probable dans une famille donnée, en l'absence de données cliniques sur la famille et la disponibilité de l'ADN des membres atteints et non atteint, risque de rendre les conclusions obtenues à partir des données de l'exome très aléatoires quant à la causalité des variants retrouvés.

Par ailleurs, les auteurs ont surestimé la pathogénicité de certains variants (Richards *et al.*, 2015). Par exemple, des variants parfois extrêmement fréquents, notamment dans la population européenne sont considérés pathogènes et responsables du phénotype des patientes. Le variant p.Pro860Ser du gène *SYCP1* a une fréquence de 1,9 % dans la population européenne dans la base de données gnomAD exome et décrit à l'état homozygote chez quatre individus. Le variant

tronquant hétérozygote du gène *RNF212* a une fréquence de 2% dans la population européenne et de 9,09% dans la population juive Ashkénaze dans la base de gnomAD. La fréquence élevée de ces variants n'est pas en faveur de leur implication, *a fortiori* à l'état hétérozygote, dans le phénotype des patientes décrits par Rouen et ses collègues.

De plus, le fait qu'un variant soit classé pathogène ou probablement pathogène selon la classification ACMG n'est pas suffisant pour établir une relation de causalité avec le phénotype étudié, en l'occurrence l'IOP. En effet, l'exome de chaque individu contient des centaines de variants y compris des variants tronquants, dont certain extrêmement rares, pouvant être considérés comme pathogènes sur la base des critères ACMG. L'établissement d'une causalité directe entre les altérations moléculaires d'un gène et une maladie nécessite une corrélation phénotype/génotype, des études de transmission génétique chez les apparentés affectés et non affectés, des études fonctionnelles ainsi qu'une comparaison avec des modèles murins ou *in vivo* correspondants. La ségrégation familiale des variants, en particulier chez la mère, est cruciale pour classer les variants hétérozygotes dans le domaine de la fertilité. Dans le cas de l'infertilité féminine, l'origine maternelle d'un variant hétérozygote pathogène ou probablement pathogène d'une mère non atteinte n'est pas en faveur de la causalité du variant. Ceci est vrai notamment pour les gènes à transmission autosomique récessive. De plus, nous pouvons exclure l'implication de ces variants hétérozygotes dans la pathogénie de l'IOP dans cette étude sur la base de modèles de souris connus (Bolcun-Filas *et al.*, 2009). Les variants de *SYCE1* rapportés dans cette étude comme étant pathogènes et responsables d'IOP à l'état hétérozygote, alors qu'au moins deux études indépendantes, impliquent ce gène dans des formes

récessives d'IOP (de Vries *et al.*, 2014; Hernández-López *et al.*, 2020; Hou *et al.*, 2022).

L'identification d'un variant hétérozygote dans un gène pour lequel le modèle murin correspondant est stérile (et donc issue d'une inactivation bi-allélique de gène correspondant), ne doit pas laisser conclure précipitamment à une relation de causalité entre ce variant hétérozygote et l'IOP. D'une part il faudra s'assurer que cette patiente n'est pas porteuse d'une seconde anomalie en trans du variant hétérozygote d'intérêt (notamment une délétion, ou variant intronique profond). Par exemple Rouen *et al* ont rapporté un variant tronquant hétérozygote de *REC8*, un gène codant un des éléments du complexe synaptonémal et de la cohésine, comme étant à l'origine d'une IOP chez une patiente. Cependant, en concordance avec le modèle murin, deux publications récentes rapportent des variations bi alléliques de ce gène chez des patients avec une infertilité masculine ou une IOP (Kherraf *et al.*, 2022; Tucker *et al.*, 2022a).

On estime que le rendement diagnostique de cette étude est plutôt de 22% (et non de 50%). L'étude génétique des IOP, comme dans tous les autres domaines, requiert une interprétation minutieuse des variants. L'étude de grandes cohortes d'IOP avec l'étude de la ségrégation des variants hétérozygotes dans des grandes familles ainsi que d'autres études sur des modèles de souris sont nécessaires pour mieux définir l'architecture génétique de l'IOP.

Genetics of primary ovarian insufficiency: a careful step-by-step approach based on solid foundations to bring new knowledge

Primary ovarian insufficiency (POI) affects 1% of women ≤40 years of age (1). Next-generation sequencing, especially whole-exome sequencing (WES), has recently unraveled many novel genetic causes (1).

Very recently, Rouen et al. (2) used WES in 36 familial cases of POI and report a positive diagnostic yield of 50% in this issue of *Fertility and Sterility*.

However, this study raises several concerns as follows:

- Number of familial forms of POI: Pedigrees were only available for 18 out of 36 families, and only 11 out of them finally corresponded to familial forms; whereas the 7 others, including the patients F1, F2, F6, F10, F12, F14, and F17 correspond to the sporadic forms (2). In total, only 11 familial and 25 isolated patients were studied.
- About the molecular studies: The variant filtering presented previously (2) shows that among the 39,522 rare variants, 15,158 variants exhibit compatible familial segregation in the 11 bona fide families. Among these variants, 648 have a predicted high impact (frameshift, truncating, or splice variants). At the end of the filtering process, the investigators retained 6 variants in this group; 14,583 variants have a low or moderate impact, but 14 variants were retained from this group without the information supporting this choice apart from the location of variants in known POI-causing genes; however; no familial transmission studies were performed. We believe that such variants cannot be used for a positive diagnosis (3).
- Misuse of the criteria of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG): The investigators have overestimated the pathogenicity of some of the variants previously described (3). In Table 1, we summarize the reinterpretation of variants in this cohort with ACMG criteria and highlight the differences and discordances found in the reports by previous investigators on variant pathogenicity (3, 4). For example, the criterion PVS1 of ACMG cannot be used for *E374K-POF1B* (that is not a null variant). Furthermore, some variants like the *P860S-SYCP1* and the *R240X-RNF212* are too frequent to support their pathogenicity (3).
- Lack of transmission studies: The fact that a variant is pathogenic or likely pathogenic variant (P/LP) (ACMG) is not sufficient to establish its causal relationship with a disease or syndrome (5). Phenotype and genotype correlations and genetic transmission studies in families are needed, especially for heterozygous variants in known autosomal recessive genes such as *EIF2B5* or *SYCE1* variants (1). Notably, the inheritance of a heterozygous P/LP variant from an unaffected mother very likely excludes a causal relationship.
- Discordance with animal models: It is not possible to extrapolate data from biallelic knockout rodent models to patients harboring only a single missense heterozygous variant of the same gene, especially when the heterozygous mice are fertile such as for *Rec8*, *Rnf212*, *Sun1*, *Syce1*, and *Sycp1* (1, 2).

In summary, only 11 families are presented. Only 12 of the 20 variants described in this article are P/LP according to the ACMG, all in previously published POI-causing genes (1). The diagnostic yield is 22% and not 50% as reported. Neither new POI genes nor any other new pathways have been described. We urge investigators to consider our concerns and make necessary edits to the article so as not to mislead the readers of *Fertility and Sterility*.

Abdelkader Heddar, M.D.
Micheline Misrahi, M.D., Ph.D.
National Reference Laboratory for Genetic Infertility in Women and Men, Unité de Génétique Moléculaire des Maladies Métaboliques et de la Reproduction, Faculté de Médecine, Université Paris Saclay, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Paris Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France; and UMR-S 1193, INSERM, Université Paris Saclay, Faculté de Médecine, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.05.024

DIALOG: You can discuss this article with its authors and other readers at https://www.fertstertdialog.com/posts/34838

REFERENCES

1. Huhtaniemi I, Hovatta O, La Marca A, Livera G, Monniaux D, Persani L, et al. Advances in the molecular pathophysiology, genetics, and treatment of primary ovarian insufficiency. Trends Endocrinol Metab 2018;29:400–19.
2. Rouen A, Rogers E, Kerlan V, Delemer B, Catteau-Jonard S, Reznik Y, et al. Whole exome sequencing in a cohort of familial premature ovarian insufficiency cases reveals a broad array of pathogenic or likely pathogenic variants in 50% of families. Fertil Steril 2022;117:843–53.
3. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med 2015;17:405–24.
4. Tucker EJ, Bell KM, Robevska G, van den Bergen J, Ayers KL, Listyasari N, et al. Meiotic genes in premature ovarian insufficiency: variants in HROB and REC8 as likely genetic causes. Eur J Hum Genet 2022;30:219–28.
5. Fridman H, Yntema HG, Mägi R, Andreson R, Metspalu A, Mezzavila M, et al. The landscape of autosomal-recessive pathogenic variants in European populations reveals phenotype-specific effects. Am J Hum Genet 2021;108:608–19.
6. Heddar A, Dessen P, Flatters D. Novel STAG3 mutations in a Caucasian family with primary ovarian insufficiency. Mol Genet Genomics 2019;294:1527–34.

TABLE 1

Reinterpretation of the variants reported by Rouen et al (2) according to the ACMG classification.

A. Variants classified pathogenic or likely pathogenic by Rouen et al. but reinterpreted as being benign or of unknown significance

Family No.	Gene	Variant	Highest MAF gnomAD exome	Highest MAF gnomAD genome	Status	Parental origin	ACMG (2)	ACMG (reinterpretation)[a]	Justification
F16	*RNF212*	NM_001193318.2: c.717_718ins	0.0211	0.115	Het.	Not maternal (Unaffected)	LP	LB	This Het. frameshift variant should be classified as LP because it is very frequent in the Ashkenazi Jewish population (2% in the gnomAD exome, and 9% in the gnomAD genome databases). In addition, mice carrying a Het. truncating variant are fertile (2).
F18	*SYCP1*	NM_001282541.1: c.2578C>T P860S	0.019	0.015	Het.	Maternal (Affected)	LP	LB	The MAFs of this variant reported in the European population in the gnomAD exome and gnomAD genome databases are 1.93% and 1.5%, respectively. Four individuals carrying this variant in a Hom. state are also described for the European population. Moreover, Het. mice carrying a truncating variant of this gene are fertile (1, 2).
F12	*SYCE1*	NM_130784.2: c.265A>G R89G	0.0109	0.015	Het.	Maternal (Unaffected)	P	Benign	This variant is observed in healthy adults. The MAFs of this variant reported in the European population in the gnomAD exome and genome databases are 1.53% and 1.09%, respectively (BS2).[b] Moreover, in the gnomAD exome database, the number of Hom. alleles is 4, therefore, >3 for a recessive gene such as for *SYCE1* (BS1).[b] Finally, the patient's unaffected mother inherited this variant (BS4).[b]
F9	*POF1B*	NM_024921.3: c.1120G>A E374K	0.000229	Novel	Hemizygous	Unknown	P	Vus	The use of PVS1[b] is not justified because the *E374K* variant of *POF1B* is not a null variant. An ACMG criterion other than PP3[b] (in silico prediction) is not justified. The variant is Het. in this patient.
F8	*PGBD3*	NM_170753.3: c.1639C>T R547C	0.0000615	0.000115	Het.	Not maternal (Unaffected)	P	Vus	This is missense variant for which multiple lines of computational evidence suggest there is no impact on the gene product (conservation, evolutionary, splicing impact)(BP4).[b]
F13	*DMRT2*	NM_181872.4: c.982G>A V328M	0.00638	0.00547	Het.	Unknown	LP	Vus	The use of PP5[b] is disputed because no reliable source recently reports this variant as pathogenic.

Heddar. Step by step exome sequencing in POI. Fertil Steril 2022.

TABLE 1

Continued.

A. Variants classified pathogenic or likely pathogenic by Rouen et al. but reinterpreted as being benign or of unknown significance

Family No.	Gene	Variant	Highest MAF gnomAD exome	Highest MAF gnomAD genome	Status	Parental origin	ACMG (2)	ACMG (reinterpretation)[a]	Justification
F1	*CPEB1*	NM_030594.4: c.23_25del	Novel	Novel	Het.	Comp Het	LP	Vus	In-frame deletion located in a repeated region of 10-base pairs (BP3),[b] the use of the PM4[b] criterion is not appropriate in the presence of a repeated region.
F14	*EPB41L2*	NM_001431.3: c.2509G>T D837Y	0.0016	0.0000648	Het.	Unknown	Vus	Vus	The use of PP5[b] is disputed because, to our knowledge, no reliable source has recently reported this variant as pathogenic.

B. The causal relationship to POI cannot be established

Family no.	Gene	Transcript ID	Highest MAF gnomAD exome	Highest MAF gnomAD genome	State	Parental origin	ACMG (2)	ACMG (reinterpretation)[a]	Justification
F15	*REC8*	NM_001048205.1: c.461A>G Q154R	Novel	Novel	Het.	Maternal (unaffected)	LP	LP	Likely pathogenic variant (splicing variant) but transmitted by an unaffected mother. Het. knockout mice are fertile (2). Moreover, a recent publication confirmed the autosomal recessive mode of inheritance of this gene in humans (4)
F17	*SUN1*	NM_001171945.1: c.43+1G>C	0.000932	0.000803	Het.	Unknown	LP	Vus	Het. knockout mice are fertile (2)
F3	*EIF2B5*	NM_003907.2: c.336C>G C112W	0.000308	0.000115	Het.	Maternal (affected)	LP	LP	We cannot use the criterion PP1[b] because there is no cosegregation of the variant of a gene definitely known to cause POI with the phenotype in multiple affected family members. *EIF2B5* is indeed known to cause a syndromic form of recessive POI (1).

C. Previously reported variants and not novel

Family no.	Gene	Transcript ID	Highest MAF gnomAD exome	Highest MAF gnomAD genome	State	Parental origin	ACMG (2)	ACMG (reinterpretation)[a]	Justification
F6	*NR5A1*	NM_004959.4: c.1126C>T L376F	0.000105	Novel	Het.	Maternal (affected)	P	P	This variant is a pathogenic variant. However, we cannot use the PVS1[b] criterion because the variant L376F of NR5A1 is not a null variant. However, this variant has been reported previously in a patient with disorder of sex development and the functional impact of this variant has been confirmed in vitro (1).
F7	*NUP107*	NM_020401.2: c.1063C>T R355C	0.000163	0.00118	Hom.	Hom.	P	LP	Reported in a familial form of POI with the corresponding mouse model. It is unclear why the investigators classify this variant as a splice acceptor variant and use the PVS1[b] criterion.

Heddar. Step by step exome sequencing in POI. Fertil Steril 2022.

TABLE 1

Continued.

C. Previously reported variants and not novel

Family no.	Gene	Transcript ID	Highest MAF gnomAD exome	Highest MAF gnomAD genome	State	Parental origin	ACMG (2)	ACMG (reinterpretation)[a]	Justification
F11	*STAG3*	NM_001282718.1: c.3052del S958X	Novel	Novel	Comp. Het	Presum Comp Het	P	P	Variant reported previously (6).
—	*STAG3*	NM_001282718.1: c.485T>G L162R	Novel	Novel	Comp. Het	Presum Comp Het	P	P	Variant reported previously. However, the use of the PVS1[b] criterion is not justified (3,6).

Note: ACMG = the American College of Medical Genetic and Genomics (3); Comp. Het = compound heterozygous; gnomAD = the Genome Aggregation Database; Het. = heterozygous; Hom. = homozygous; LB = likely benign; LP = likely pathogenic; MAF = Minor allele frequency; P = pathogenic; POI = primary ovarian insufficiency; Presum Comp Het = presumed compound heterozygous; Vus = variant of unknown significance.

[a] The reinterpretation of the variant was performed using Varsome (https://varsome.com/) and InterVar (https://wintervar.wglab.org/). The highest MAF in gnomAD exome and in gnomAD exome databases correspond to the highest MAF of the variant in the different populations of the exome and the gnomAD genome databases, respectively.

[b] Below the ACMG criteria used to reinterpret variants:

Benign

BA1: allele frequency is >5% in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium.

BS2: observed in a healthy adult individual for a recessive (homozygous), dominant (heterozygous), or X-linked (hemizygous) disorder, with full penetrance expected at an early age.

BP3: in-frame deletions or insertions in a repetitive region without a known function.

BP4: multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact).

Pathogenic

PVS1: null variant (nonsense, frameshift, canonical ± 2 splice sites, initiation codon, single or multiexon deletion) in a gene where LOF is a known mechanism of disease.

PS3: well-established in vitro or in vivo functional studies supportive of a damaging effect on the gene or gene product.

PM4: protein length changes as a result of in-frame deletions or insertions in a non-repeat region or stop-loss variants.

PP5: reputable source recently reports variant as pathogenic, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation.

PP1: cosegregation with disease in multiple affected family members in a gene definitively known to cause the disease.

Heddar. Step by step exome sequencing in POI. Fertil Steril 2022.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

4 SYNTHESE ET DISCUSSION GENERALE

Diagnostic génétique, héritabilité et architecture moléculaire de l'IOP

Nous confirmons la grande hétérogénéité génétique de l'IOP puisque chaque gène n'est responsable que d'une proportion faible ne dépassant jamais 2% dans notre cohorte. Ceci a limité probablement l'utilisation en routine du NGS dans le cadre de l'IOP. En revanche, en incluant ensemble les gènes démontrés avec un rôle dans l'IOP dans un panel large, comme c'est le cas de notre travail, nous observons qu'environ 30% des patientes ont une étiologie monogénique. Une bonne partie des patientes considérées comme d'étiologie indéterminée, soit 70-80% des cas selon la littérature (Rossetti *et al.*, 2017; Huhtaniemi *et al.*, 2018a), serait donc d'origine génétique. Un diagnostic génétique de certitude peut donc être retrouvé dans environ 50% des cas (Incluant les causes chromosomiques et la prémutation de *FMR1*). Un diagnostic étiologique précis permet une meilleure acceptation du diagnostic d'IOP et par la suite une meilleure adhésion à la prise en charge de la patiente mais également permettra d'offrir un conseil génétique et un diagnostic précoce pour les apparentées. Une étude génétique approfondie devrait être proposée à toute patiente avec IOP sans étiologie identifiée en pratique clinique. Ne pas faire de telles explorations génétiques avec les technologies actuelles prive ces patientes d'un diagnostic étiologique. Or les études en NGS avec un panel de gènes ou par le séquençage de l'exome ne sont pas utilisées en pratique de routine dans le domaine de la reproduction. Pour l'IOP, seuls le caryotype et la recherche de prémutation du gène FMR1 sont réalisés en routine dans la majorité des centres et ce sont les seuls examens recommandés actuellement par la société européenne de médecine de la reproduction (European Society for

Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI *et al.*, 2016).

Nous ne confirmons pas les données des études antérieures obtenues à partir de petites cohortes de patientes ou avec des panels incluant un nombre limité de gènes dont la performance diagnostique décrite peut atteindre les 50% ou de 10-15 % pour un seul gène unique (Bouilly *et al.*, 2011, 2016; Qin *et al.*, 2015b; Rouen *et al.*, 2022). Ceci est probablement lié à une surestimation de la pathogénicité des variants détectés (Heddar and Misrahi, 2022; Tucker *et al.*, 2022b).

Cette étude d'une large cohorte nous a permis de décrire également pour la première fois l'architecture génétique de l'IOP. Schématiquement trois grandes familles de gènes expliquent plus de 90% des étiologies génétiques de l'IOP. Les deux familles majoritaires sont celles des gènes de méiose et de la réparation d'ADN (37.4%) suivie de près par les gènes de la croissance folliculaire (35.4%) et en troisième position les gènes du métabolisme ou de fonction mitochondriale (19%). Notre étude clinique est en concordance avec les données expérimentales et *in silico* des gènes connus impliqués dans l'IOP. En effet, comme illustré dans la figure 15, les trois clusters de gènes impliqués dans l'IOP avec une forte interaction, sont ceux identifiés dans notre étude comme majoritaire.

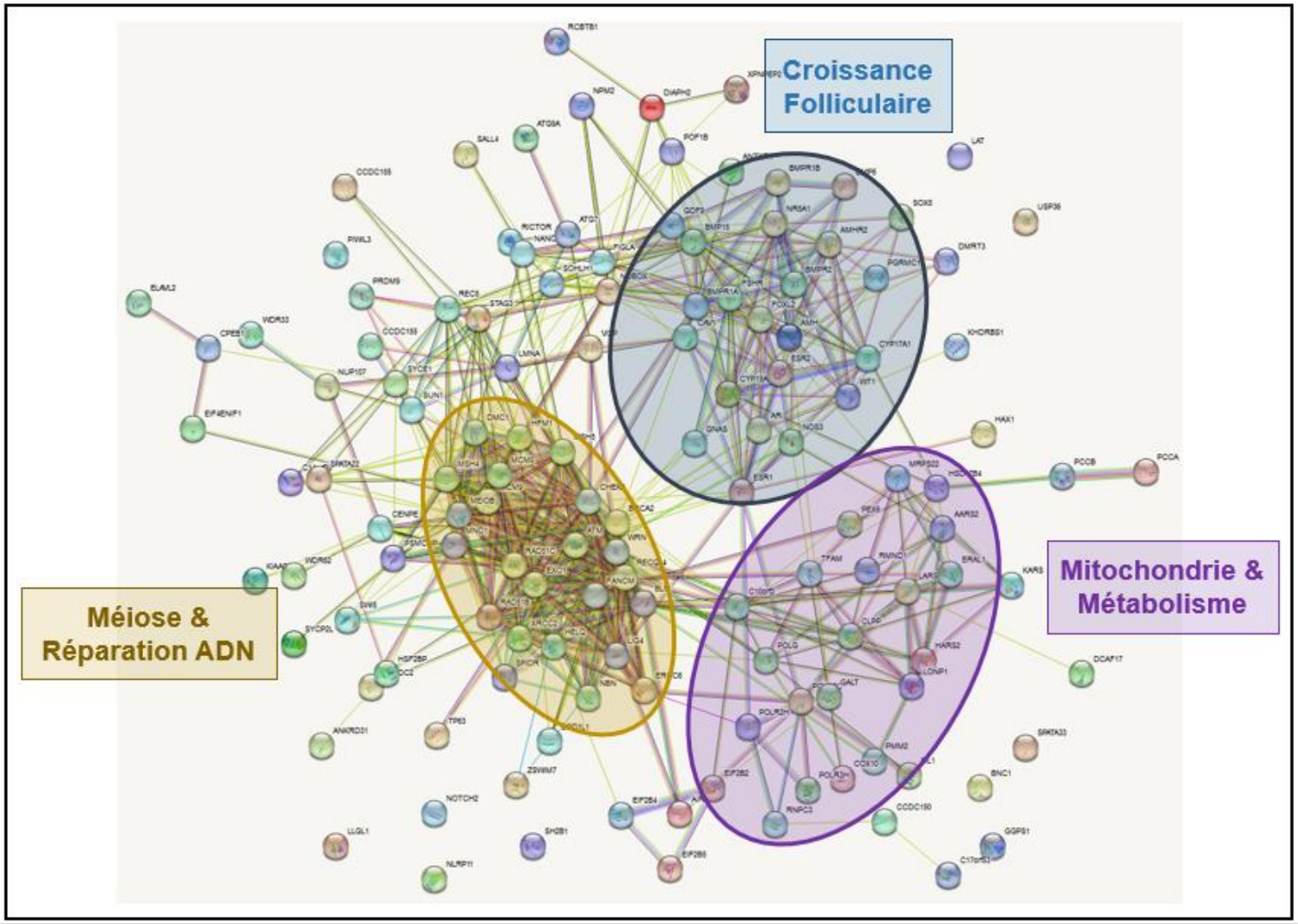


Figure 15 : Réseau des gènes impliqués dans l'IOP (en utilisant le logiciel selon String https://string-db.org**)**

Dans notre cohorte, l'héritabilité est soit récessive dans 40% des cas, dominante dans 52% des cas et liée à l'X dans 8% des cas. Aucune mutation *de novo* n'a été détectée chez nos patientes pour lesquelles une ségrégation familiale a été réalisée. Nous ne disposons pas de suffisamment d'arguments pour une héritabilité polygénique ou multigénique précédemment suggérée dans l'IOP.

Avec la découverte continue de nouveaux gènes dans l'IOP, la performance du diagnostic génétique dans l'IOP devrait s'accroitre et il ne serait pas étonnant qu'une partie non négligeable des IOP dites idiopathiques, y compris les formes sporadiques et sans consanguinité, puisse avoir un déterminisme génétique. L'exploration pangénomique de ces patientes par exome ou par génome notamment dans le cadre du plan France médecine génomique (PFMG) permettra d'améliorer le diagnostic génétique de ces patientes. En effet, depuis 2019, l'IOP a été l'une des premières préindications retenues par le plan France Médecine Génomique (PFMG) à la demande de notre laboratoire. Désormais, toute patiente avec IOP sans étiologie génétique identifiée avec un panel de gène ou même par un exome peut bénéficier d'une analyse génomique dans le cadre du PFMG.

Conseil génétique de l'IOP : Application pratique et cas particulier des gènes à expressivité et pénétrance variables et ceux avec un risque néoplasique

En plus de proposer un diagnostic étiologique précis pour ces patientes « sans diagnostic » selon les standards de la prise en charge diagnostique actuelle de l'IOP, l'étude génétique, comme nous l'avons présentée dans ce travail, peut permettre une prise en charge globale de l'état de santé de ces patientes, non uniquement centrée sur leur problème de fertilité. En effet, l'IOP peut être l'unique symptôme révélateur

d’une pathologie complexe, affectant plusieurs organes, sous-diagnostiquée ou méconnue par le clinicien. Il peut s‘agir de maladie métabolique comme la galactosémie ou les anomalies de glycosylation, une maladie immunitaire comme le syndrome APECED ou des maladies à révélation tardive ou à expressivité variable. Ce dernier groupe concerne notamment les gènes de la voie du TGFβ qui a des rôles majeurs dans divers organes,notamment l’ovaire et le poumon mais qui est également impliquée dans le cancer. Toutes ces protéines sont exprimées à la fois dans les poumons et les ovaires, en particulier dans les cellules de la granulosa, et ont des rôles dans les deux tissus (Persani *et al.*, 2014; Huhtaniemi *et al.*, 2018a; Morrell *et al.*, 2019). De ce fait, cette voie est impliquée à la fois dans l’Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) mais également dans la croissance folliculaire. Nous avons confirmé des observations isolées de patientes avec IOP et variants hétérozygotes de *BMPR1B, CAV1* et surtout *BMPR2*, un gène majeur de prédisposition génétique à l’HTAP (Morrell *et al.*, 2019). Sous réserve d’un examen clinique détaillé, nos patientes avec IOP, mais également celles déjà rapportées dans la littérature, ne présentaient pas de symptomatologie pouvant faire suspecter une HTAP. L'absence de signe d’HTAP, en particulier chez les patientes porteuses de variants de *BMPR2,* peut s'expliquer par plusieurs mécanismes : i) le type de variant ; en effet, 50 à 75 % des variants de *BMPR2* détectés chez les patients présentant une HTAP étaient des variants tronquants alors que dans le cadre de l’IOP, seuls des variants faux-sens ont été identifiés (Hamid *et al.*, 2009; Girerd *et al.*, 2016); ii) la localisation du variant : la majorité des variants de *BMPR2* rapportés à ce jour chez les patients atteints d'HTAP sont localisés dans le domaine kinase de la protéine (codé par l'exon 6-10)(Girerd *et al.*, 2016) alors que trois des quatre variants de *BMPR2* détectés chez les patientes avec IOP sont localisées dans le domaine cytosolique de *BMPR2* (les variants L656S

et R597Q que nous décrivons ici et le variant S987F rapporté précédemment (Patiño *et al.*, 2017). De plus, Il a été rapporté que les patients porteurs d'une mutation affectant le domaine cytosolique de *BMPR2* se caractérisaient par un âge d'apparition des symptômes plus tardif par rapport aux porteurs des autres mutations de *BMPR2* (Girerd *et al.*, 2015) et iii) la faible pénétrance de la mutation observée pour les gènes de l'HTAP notamment pour *BMPR2* (Hamid *et al.*, 2009; Morrell *et al.*, 2019). La pénétrance des mutations de *BMPR2* est estimée de 20 à 43 % (Hamid *et al.*, 2009; Morrell *et al.*, 2019). Une discussion pluridisciplinaire est nécessaire pour la prise en charge de ces patientes.

Par ailleurs, une sous popualtion de patientes avec IOP peut avoir un risque plus élévé de cancer en rapport avec une altération moléculaire d'un gène de réparation de l'ADN comme les gènes de la voie Fanconi (voir plus bas) (Tableau 3). Incluant *BRCA1*, seul sept gènes sont connus à ce jour pour être responsable également des tumeurs/cancers dans l'espèce humaine : *BRCA1*, *BRCA2, FANCM, MCM8, MCM9, PSMC3IP, STAG3* (Zangen *et al.*, 2011; Caburet *et al.*, 2014, 2020a; Fouquet *et al.*, 2017a; Weinberg-Shukron *et al.*, 2018; Heddar *et al.*, 2019a, 2020a; Golubicki *et al.*, 2020; Goldberg *et al.*, 2021). Mais la majorité des souris déficientes dans cette famille de gènes de réparation de l'ADN ont développé des tumeurs (Jiao *et al.*, 2021). Des études prospectives sur des cohortes plus larges de patientes permettront une évaluation plus précise du risque de tumeurs/cancers au long cours chez ces patientes avec variants pathogènes ou probablement pathogènes de gènes de réparation d'ADN. Une surveillance approfondie et attentive de ces patientes est nécessaire. Ceci justifie donc une étude génétique systématique chez toute patiente présentant une IOP. Ceci permettra de proposer une médecine personnalisée au-delà de la fertilité. Une prise en charge globale multidisciplinaire incluant gynécologue,

biologiste de la reproduction, généticien, onco-généticien et autres spécialistes en fonction du gène responsable, est nécessaire. Une surveillance à long terme de ces patientes est recommandée.

Table 3: Gènes de méiose et de réparation de l'ADN impliqués dans l'IOP apparemment isolée

Gène	Transmission	Aménorrhée	Grossesse	Signes associés ou cancer	Références
BRCA2	**AR**	**Primaire**	**No**	**Anémie de Fanconi**	(Weinberg-Shukron *et al.*, 2018; Turchetti *et al.*, 2019; Caburet *et al.*, 2020a; Heddar *et al.*, 2022b)
FANCM	**AR**	**Secondaire**	**Oui**	**Cancer du sein, colon,**	(Fouquet *et al.*, 2017a; Catucci *et al.*, 2018; Heddar *et al.*, 2022b)
FANCU	**AR**	**Primaire**	**No**	**Anémie de Fanconi**	(Zhang *et al.*, 2019b)
MCM8	**AR**	**Primaire**	**No**	**Hypothyroïdie, petite taille, pilomatricomes, cancer du colon**	(AlAsiri *et al.*, 2015; Golubicki *et al.*, 2020; Heddar *et al.*, 2020a, 2022b)
MCM9	**AR**	**Primaire**	**No**	**Petite taille, hypothyroïdie, cancer du colon**	(Wood-Trageser *et al.*, 2014; Goldberg *et al.*, 2015, 2021; Heddar *et al.*, 2022b)
STAG3	**AR**	**Primaire**	**No**	**Cancer de l'ovaire**	(Caburet *et al.*, 2014; Heddar *et al.*, 2019a, 2022b)
PSMC3IP	**AR**	**Primaire**	**No**	**Cancer du Sein**	(Zangen *et al.*, 2011; Schubert *et al.*, 2017; Al-Agha *et al.*, 2018; Heddar *et al.*, 2022b)
MSH4	AR	Secondaire	No	Aucun	(Carlosama *et al.*, 2017; Heddar *et al.*, 2022b)
MSH5	AR	Secondaire	No	Aucun	(Guo *et al.*, 2017)
SPIDR	AR	Primaire	No	Aucun	(Smirin-Yosef *et al.*, 2017; Heddar *et al.*, 2022a)
HFM1	AR	Secondaire	Oui	Aucun	(Wang *et al.*, 2014; Heddar *et al.*, 2022b)
SYCE1	AR	Primaire	No	Dystrophie maculaire de la rétine	(Hernández-López *et al.*, 2020)
MEIOB	AR	Secondaire	Oui	Aucun	(Caburet *et al.*, 2019)
HSF2BP	AR	Secondaire	Oui	Aucun	(Felipe-Medina *et al.*, 2020)
RAD51B	AR	Primaire	No	Aucun	(Franca *et al.*, 2022)

CSB-PGBD3	AD	Secondaire	Oui	Aucun	(Qin *et al.*, 2015a; Heddar *et al.*, 2022b)
BNC1	AD	Secondaire	Oui	Aucun	(Zhang *et al.*, 2018a; Heddar *et al.*, 2022b)
Wdr62	AD	Secondaire	No	Aucun	(Zhou *et al.*, 2018a)

AR : Autosomique recéssive ; AS : autosomique dominant ; en gras les gènes associés à un cancer.

Cette étude permet également d'avoir des éléments pronostiques. Compte tenu de l'implication des différentes voies moléculaires de l'IOP dans des étapes différentes de l'établissement de la réserve ovarienne ou de la croissance folliculaire, l'étude génétique permettra de stratifier les patientes avec IOP et apportera des éléments indicatifs sur la qualité de la réserve ovarienne. Il est classiquement rapporté que 5% des patientes avec IOP peuvent avoir une résomption de la fonction ovarienne et parfois des grossesses. A la lumière de nos résultats, on peut spéculer que les chances de grossesse de ces patientes avec IOP sont différentes en fonction de la cause génétique sous-jacente. Les patientes avec une altération moléculaire des gènes de la croissance folliculaire ou du métabolisme devraient avoir le plus de chance d'avoir une grossesse puisque leur réserve est prédite préservée au moins initialement. En concordance avec cette hypothèse, les patientes présentant une IOP en rapport avec une galactosémie, une maladie métabolique rare, ont 20 fois plus de chance d'avoir une grossesse à deux ans par rapport aux autres causes d'IOP (van Erven *et al.*, 2017). Ceci est probablement vrai pour d'autres étiologies génétiques métaboliques de l'IOP comme *POLG*, *PMM2* qui sont en général responsables d'IOP avec aménorrhée secondaire avec plusieurs grossesses décrites.En cas de réserve ovarienne prédite altérée ou absente, notamment en cas d'une altération majeure d'un gène de méiose ou de la réparation d'ADN, les chances de grossesses sont très faibles. L'orientation rapide des patientes vers le don d'ovocyte ou l'adoption est nécessaire. En revanche, en cas de mutation génétique n'impactant pas l'établissement de la réserve ovarienne, une orientation vers une préservation précoce de la fertilité doit être conseillée pour la patiente et sa famille avant la perte irréversible du capital

folliculaire. La prise en compte de la cause génétique à l'origine de l'IOP pourrait préciser les chances de grossesses spontanées des patientes. Il est vraisemblable que le chiffre de 5% pour les chances de grossesse spontanée dans l'IOP reflète une moyenne qui est différente en fonction de l'altération moléculaire à l'origine de l'IOP. S'agissant que plus de 60% des patientes avec IOP de notre cohorte ont une réserve prédite conservée, on peut spéculer que ce groupe de patiente à plus de chance d'avoir une grossesse. Leur chance sera donc de 12.5% (5 % /1-0.6)) et non pas 5%. Ceci peut aider les patientes, surtout si elles sont jeunes, et les apparentées porteuses de l'altération moléculaire dans la planification de leur projet parental.

L'anémie de Fanconi peut être révélée par une IOP parfois isolée

Même si les troubles de la fertilité chez les patients présentant une anémie de Fanconi ayant atteint l'âge de la puberté ou l'âge adulte ont été décrits à la fois chez l'homme et chez la femme, comme d'autres troubles endocriniens, la première implication d'un gène de cette voie dans une infertilité isolée chez l'homme et la femme n'a été faite qu'en 2017 par les équipes du Pr Misrahi et le Pr Reiner A Veitia (Fouquet *et al.*, 2017a). En effet, l'étude par exome d'une famille Finlandaise consanguine comprenant deux sœurs présentant une IOP avec aménorrhée secondaire, a mis en évidence une mutation tronquante homozygote de *FANCM.* Celle ci étant associée à une fragilité chromosomique élevée dans les lymphocytes des deux sœurs en faveur d'une anomalie de réparation des cassures double brin et de l'atteinte de la voie de Fanconi. Pourtant la patiente et sa famille n'avaient aucun signe ou d'antécédent de cancer ou d'AF. Par la suite, des équipes

indépendantes ont montré l'implication de *FANCM* dans l'infertilité masculine (Kasak *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 2019) mais également dans des cancers, en particulier le cancer du sein à début précoce, de l'ovaire, de la tête et du cou, du colon (Catucci *et al.*, 2018). *FANCM* apparait donc comme un gène suppresseur de tumeur.

Dans ce travail de thèse, nous avons montré l'implication de deux autres gènes de cette voie de Fanconi à savoir *BRCA1 et BRCA2,* deux gènes majeurs de prédisposition génétique au cancer du sein et de l'ovaire, dans l'IOP*.* Alors que la patiente avec deux troncatures bi-alléliques de *BRCA1* correspond, après réévaluation clinique, à un phénotype modéré d'une AF passée inaperçue en l'absence de développement d'insuffisance médullaire ou de pathologie tumorale, les deux patientes que nous décrivons ici avec deux mutations homozygotes de *BRCA2* ont un phénotype strictement limité à une atteinte ovarienne. Ceci est également le cas pour les patientes avec variants bi-alléliques de *FANCM*.

En incluant l'ensemble de nos patientes étudiées par NGS, nous révélons que la voie de Fanconi est responsable d'environ 2% des formes d'IOP. Une autre équipe a rapporté par la suite l'implication d'un autre gène de la voie Fanconi *FANCU ou XRCC2* dans une IOP isolée (Zhang *et al.*, 2019b)*.* On peut spéculer que l'altération de cette voie peut être une cause génétique récurrente dans l'IOP et que les 18 autres gènes de cette voie pourraient être impliqués prochainement dans des IOP y compris les IOP isolées.

L'ensemble de ces études génétiques a permis de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie mais également la fréquence des troubles de la fertilité chez les rares patientes présentant une AF qui survivent jusqu'à l'âge adulte ou l'adolescence.

Les données actuelles sur le lien entre IOP et les gènes de la voie Fanconi justifient à notre sens l'étude moléculaire des gènes de cette voie dans l'IOP et par extension dans l'infertilité masculine également (voir plus bas). Comme *BRCA1* et *BRCA2* sont deux gènes majeurs de susceptibilité au cancer (Walsh *et al.*, 2011; Kuchenbaecker *et al.*, 2017), l'information pré-test donnée aux patientes avant l'analyse d'exome ou de panel NGS dans le cadre d'une IOP doit aborder la possibilité d'une altération moléculaire d'un gène de réparation de l'ADN y compris *BRCA1* et *BRCA2.* C'est également le cas dans la prise en charge des patientes atteintes d'IOP et de leurs proches. Néanmoins, une discussion entre les sociétés savantes dans le domaine de la reproduction, la génétique et de l'oncogénétique devrait statuer sur le screening moléculaire en routine diagnostique des gènes de la voie Fanconi y compris *BRCA1* et *BRCA2* puis établir des recommandations de suivi et de prise en charge.

Une IOP avec petite taille doit faire évoquer une altération de la réparation de l'ADN : Intérêt d'un bilan génétique avant traitement par hormone de croissance

Une petite taille chez une adolescente, surtout si elle est associée à une aménorrhée primaire, fait évoquer en premier lieu le syndrome de Turner correspondant à la principale anomalie gonosomique chez la femme et une des principales étiologies chromosomiques de l'IOP. La prise en charge thérapeutique de la petite taille fait appel souvent à l'hormone de croissance dont l'utilisation n'est pas dénuée d'effet secondaire notamment une augmentation d'incidence de cancer

en cas de fragilité chromosomique constitutionnelle, en stimulant la croissance des cellules malignes (Swerdlow *et al.*, 2017). Or la petite taille est un signe fréquent dans des syndromes caractérisés par une fragilité chromosomique constitutionnelle comme par exemple l'anémie de Fanconi et le syndrome de Bloom (García-de Teresa *et al.*, 2017). En présence d'une telle fragilité chromosomique sous-jacente, l'utilisation de l'hormone de croissance est contre-indiquée. Les études génétiques de l'IOP, incluant notre travail, ont fait émerger deux nouveaux gènes *MCM8* et *MCM9*, associés à une fragilité chromosomique et dont le phénotype peut inclure un retard de croissance avec petite taille. Ces deux gènes doivent être considérés comme des nouvelles causes de syndrome de fragilité chromosomique. Non seulement, l'IOP des patientes avec altération bi-allélique de *MCM8* ou de *MCM9* peuvent associer une petite taille mais également une augmentation du risque néoplasique à la fois par des tumeurs cutanées ou des cancers colorectaux.

Ces données ont une implication thérapeutique immédiate pour les patientes avec petite taille et celles avec une altération moléculaire de *MCM8* ou de *MCM9*. En effet, il est nécessaire d'évoquer puis de rechercher les mutations de ces deux gènes comme une cause probable de fragilité chromosomique en présence de petite taille et d'IOP à caryotype normal, et ce avant de débuter un traitement par hormone de croissance. Une prise en charge personnalisée et multidisciplinaire est également nécessaire. Un suivi au long cours est recommandé.

Pistes physiopathologiques pour expliquer le lien entre réparation d'ADN et IOP isolée.

L'utilisation du NGS dans le cadre de l'IOP a permis de révéler des étiologies croissantes de gènes responsable d'IOP avec en particulier les gènes de méiose et de la réparation d'ADN. En effet, 17 des 23 gènes identifiés par exome ces 10 dernières années sont impliqués dans la méiose et la réparation d'ADN (Zangen *et al.*, 2011; Caburet *et al.*, 2014, 2019, 2020a; de Vries *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Wood-Trageser *et al.*, 2014; AlAsiri *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2015a; Carlosama *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2017; Smirin-Yosef *et al.*, 2017; Al-Agha *et al.*, 2018; He *et al.*, 2018b; Weinberg-Shukron *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018b; Felipe-Medina *et al.*, 2020; Franca *et al.*, 2022). Sans remettre en question le rôle majeur de cette voie dans l'IOP comme discuté plus haut, Il convient de noter qu'il y a une surreprésentation de cette famille de gènes parmi les récentes publications (17/23 soit 74% des gènes). La surreprésentation de cette famille de gènes peut être liée à un biais de sélection des patientes étudiées par exome et publiées à ce jour. En effet, la majorité des études d'exome publiées à ce jour ont été réalisées dans des familles consanguines et l'héritabilité des gènes de méiose et de la réparation d'ADN dans l'IOP est majoritairement autosomique récessive.

Paradoxalement parmi l'ensemble de ces gènes de réparation de l'ADN à l'origine d'une IOP, uniquement 7 sont responsables à la fois d'IOP et de cancer dans l'espèce humaine (Tableau 3). Plusieurs explications peuvent être discutées. Ces gènes peuvent avoir un effet spécifique dans la méiose (*STAG3, REC8*) ou uniquement un rôle accessoire dans les cellules somatiques *(SPIDR, MSH4, MSH5*). Enfin nos arguments fonctionnels développés dans ce travail, en

complément des données de la littérature, permettent de proposer l'existence d'un effet seuil entre la sensibilité des cellules méiotiques et mitotiques quant à la réparation des cassures double brin par recombinaison homologue. Ainsi l'activité résiduelle de ces mutants est suffisante pour réparer les rares cassures survenant dans les cellules somatiques mais se révèle insuffisante pour la réparation des cassures au niveau des cellules méiotiques survenant par centaines simultanément. Les conséquences en sont une altération de la méiose anténatale. Le défaut de réparation de l'ADN peut cependant être mis en évidence par la cytogénétique dans les cellules somatiques en présence d'un agent toxique pour l'ADN, mais il ne s'exprime pas à l'état basal. Compte tenu de la présence de multiples systèmes de réparation d'ADN dans l'ovaire (Stringer et al., 2020; Shukla et al., 2021), les mutations hypomorphes de ces gènes impliqués dans la réparation d'ADN (*ERCC1, PMS2, MLH1, MLH3*…) peuvent être découverte prochainement à l'origine d'une IOP isolée.

Nouveaux gènes et nouvelles voies moléculaires identifiées

En l'absence de mutation identifiée par le panel de gènes choisi, la poursuite par l'étude de l'exome est un outil puissant pour l'identification de nouvelles étiologies génétiques en particulier dans les formes consanguines et familiales. A l'exception de *BRCA1* identifié chez une patiente présentant un phénotype modéré d'une anémie de Fanconi, les 10 autres gènes, que nous décrivons dans cette thèse, ont été identifiés dans des IOP strictement isolées y compris après réévaluation clinique. Dix variants tronquants et trois faux-sens ont été identifiés dans ces 11 gènes soit à l'état homozygote (n=6), hétérozygote

composite (n=6) ou hétérozygote (n=1), l'héritabilité de ces nouveaux gènes est donc majoritairement autosomique récessive. Le phénotype de 5 modèles murins ou de drosophile, tous infertiles, est disponible pour 5 gènes (*BRCA2, HROB, HELQ, ELAVL2, NLRP11*) confirmant l'implication de ces gènes dans l'IOP.

D'une manière intéressante ces gènes permettent d'impliquer des nouvelles voies moléculaires dans l'IOP isolées à savoir les modifications post-traductionnelles des protéines (*ELAVL2*), la mitophagie (*SPATA33*) ou l'immunité (*NLPR11*). Cela permet de mieux comprendre la physiopathologie des IOP et ouvre la voie au développement de nouvelles thérapies ciblées. Par ailleurs, nous avons confirmé le rôle important des gènes de la réparation d'ADN en identifiant 6 nouveaux gènes (*BRCA1, BRCA2, HELQ, HROB, SWI5, CENPE*). D'une manière intéressante, une étude publiée après la soumission de notre article a rapporté un variant tronquant homozygote de *HROB* dans une IOP isolée confirmant nos données pour ce gène (Tucker *et al.*, 2022a). Enfin, deux gènes de fonction inconnue (*CCDC155, CCDC185*) d'expression exclusivement gonadique ont été identifiés. La validation fonctionnelle de l'impact des altérations moléculaires de ces nouveaux gènes sur la reproduction nécessite le développement de modèles murins ou cellulaires appropriés. Ceci pourrait permettre d'identifier des nouveaux mécanismes physiopathologiques dans l'IOP et eventuellement des nouvelles pistes thérapeutiques comme la voie Hippo/PTEN/mTOR.

Perspectives thérapeutiques et thérapies innovantes

La première application pratique de la génétique de l'IOP sur le plan thérapeutique peut avoir une application à court terme. Il s'agit de la potentielle

valeur prédictive de la persistance d'une réserve ovarienne en vue de l'utilisation des technologies innovantes d'activation folliculaire in vitro (*In vitro Activation* ou IVA). Comme dit plus haut en introduction, le pool initial des follicules primordiaux établi pendant la vie anténatale (estimé à 6-7 million) va subir une atrésie physiologique, ce qui est la voie majoritaire, ou reste quiescent en attendant d'être « recruté » dans une vague de croissance folliculaire (Figure 16) (Huhtaniemi *et al.*, 2018a). Cette activation des follicules est régulée par plusieurs voies moléculaires dont la voie PTEN /PI3K/AKT/mTOR (Grosbois *et al.*, 2020). En manipulant cette voie chez la souris puis chez la femme, une équipe américaine a apporté la preuve de principe de la possibilité d'activer ce pool dormant de follicules primordiaux *in vitro* (Li *et al.*, 2010; Kawamura *et al.*, 2013). En utilisant une combinaison initiale associant un inhibiteur de PTEN et un activateur de AKT sur des fragments ovariens prélevés à partir d'une cohorte de 27 patientes avec IOP, Cette équipe a pu obtenir 5 ovocytes matures et une naissance vivante après FIV-ICSI (Kawamura *et al.*, 2013). L'extension de cette étude par la même équipe chez 10 patientes supplémentaires permettant au total d'obtenir des résultats encourageants, avec une croissance folliculaire dans 24.3% des cas (9/37), une grossesse biologique dans 8.1% des cas (3/37) et deux naissances vivantes (5.4%) (Grosbois *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2021). D'autres études basées sur l'inhibition de la voie Hippo uniquement en fragmentant les ovaires des patientes ont pu obtenir des résultats similaires mais avec des taux de grossesse très variables allant de 4 à 21% (Wu *et al.*, 2021). Cette variabilité du taux de grossesse de cette technique peut être liée à la persistance ou non d'une réserve ovarienne avant procédure, ce qui n'est jamais évalué actuellement. Or l'étude génétique comme nous l'avons présentée dans ce

travail permet de mettre en evidence l'existence dans certains cas d'un blocage génétique de la croissance folliculaire responsable de l'IOP de la patiente et donc peut prédire la persistance d'une réserve ovarienne. La sélection des patientes avec une génétique favorable sans altération prédite de la réserve ovarienne pourrait permettre d'améliorer l'efficacité et le rendement de ces techniques. En attendant le développement de ces techniques en France, il pourra être proposé une préservation rapide de la fertilité pour éviter la dégradation rapide de cette réserve ovarienne, en vue de la prise en charge future de ces patientes par ces nouvelles techniques de maturation folliculaire *in vitro,* IVA ou reveil de follicules dormants.

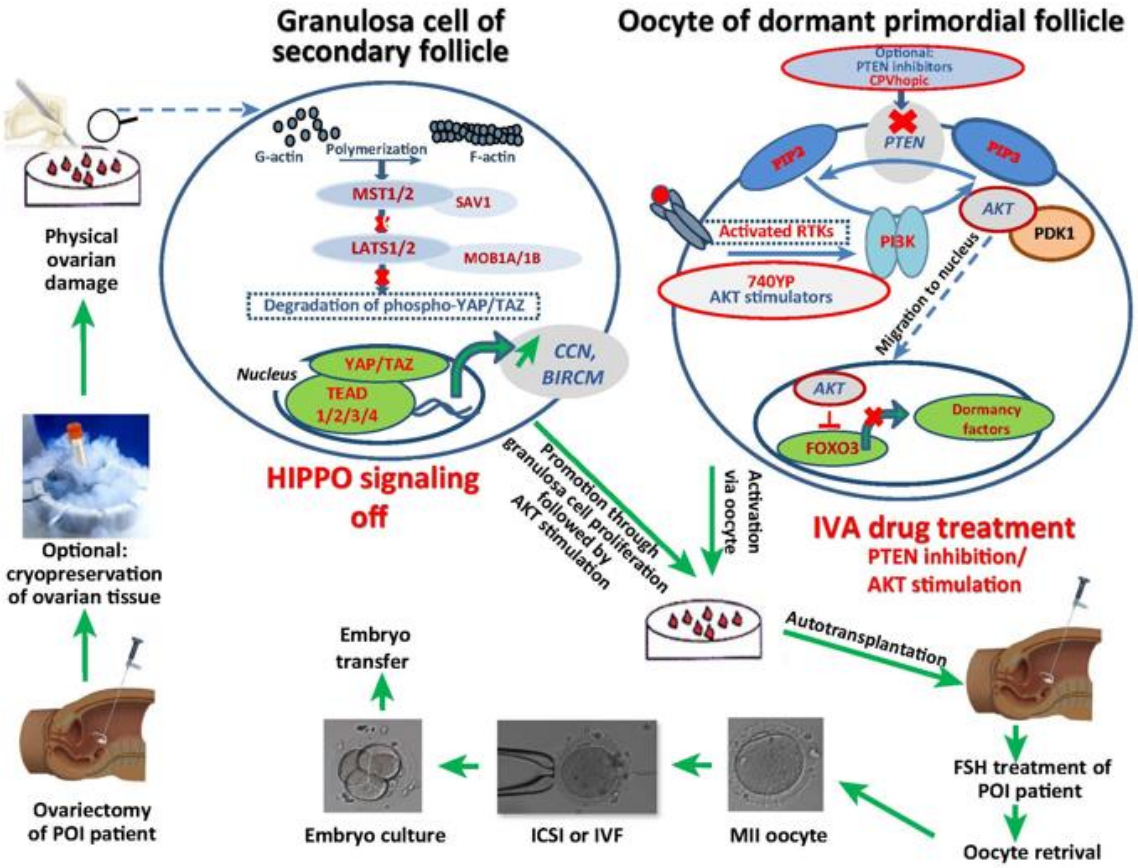


Figure 16 : Principe de l'activation folliculaire *in vitro* et application chez la femme. Adapté de Huhtaniemi et al., 2018 (voir annexe). Le tissu cortical ovarien est biopsié par laparoscopie de la patiente. Le tissu est coupé en tranches ce qui active l'initiation de la croissance folliculaire. Le tissu tranché est ensuite activé à l'aide d'un inhibiteur de PTEN ou d'un stimulateur AKT in vitro pendant 24 heures.Les follicules activés sont stimulés à l'aide de l'hormone FSH humaine recombinante pendant 6 à 10 jours, jusqu'à ce que des follicules antraux de 15 à 17 mm soient vus par échographie. La femme recevra de l'hormone lutéinisante (LH) recombinante humaine pour induire la maturation finale des ovocytes. Les ovocytes sont prélevés 36 heures plus tard par aspiration transvaginale à l'aiguille guidée par échographie. Ils sont injectés par injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) avec le sperme du partenaire. Les embryons sont cultivés pendant 3 à 5 jours et le meilleur embryon morphologiquement sera transféré dans l'utérus de la patiente.

Déterminisme génétique de l'IOP,lien avec l'âge de la ménopause naturelle et avec l'espérance de vie et la longévité

Les études d'association à l'échelle du génome (GWAS), dont une très récente chez plus de 200.000 femmes (Ruth *et al.*, 2021), ont révélé des variations génétiques polymorphiques à effet faible pouvant impacter l'âge physiologique de la ménopause de quelques semaines à plus d'un an alors que les études NGS ont identifié des dizaines de causes monogéniques de l'IOP avec une hérédité Mendélienne. D'une façon intéressante les variations de ces gènes impliqués dans la ménopause ou l'IOP peuvent impacter des voies moléculaires communes notamment la réparation d'ADN (*MCM8, FANCM, BRCA2*) ou le métabolisme (*POLG*). Dans ce travail de thèse, nous révélons trois nouveaux gènes communs dans le déterminisme génétique de l'IOP et de l'âge de la ménopause. En plus du gène *HELQ*, impliqué dans la réparation de l'ADN, deux nouvelles voies moléculaires communes émergent à savoir l'immunité (*NLRP11*) et les modifications post-traductionnelles (*ELAVL2*). Pour l'ensemble de ces voies moléculaires communes entre IOP et ménopause, Il semble exister un continuum entre les altérations génétiques à fort impact responsables d'IOP, identifiées par le séquençage d'exome, et les variants à effet faible impliqués dans la variabilité de l'âge de la ménopause, identifiés par GWAS dans des cohortes importantes de patientes. Une population intéressante à étudier pour confirmer ou infirmer ce continuum entre IOP et ménopause est celle des femmes qui développent une ménopause précoce c'est à dire entre 40 et 45 ans et qui touche jusqu'à 6% de la population féminine. Ce déterminisme génétique commun entre l'IOP et l'âge de la

ménopause et la longévité peut expliquer les observations des études épidémiologiques faisant un lien direct entre l'IOP, la variation de l'âge de la ménopause et la diminution de l'espérance de vie et ceux indépendamment des comorbidités associés à ces affections. Ce déterminisme implique en particulier la famille des gènes de méiose et de la réparation d'ADN.

La génétique révèle des étiologies communes entre l'IOP et l'infertilité masculine

Il existe des étiologies génétiques communes entre l'infertilité masculine avec azoospermie non obstructive et l'IOP. En plus des gènes impliqués dans les stades précoces du développement des gonades (comme *NR5A1* et *WT1*) et des cellules germinales, les études par NGS ont révélé d'autres étiologies communes entre les deux affections en particulier les gènes de méiose et de la réparation d'ADN. On compte à ce jour 17 gènes communs (Tableau 4). Ces gènes sont impliqués dans le développement des gonades (*NR5A1, WT1 et AR*), la méiose et le complexe cohésine (*STAG3, REC8*, *MEIOB*, *SPATA22)* et la réparation d'ADN (*C14orf39, FANCM, FBXO43, HFM1, MCM8, MSH4, MSH5, PSMC3IP, SPIDR, ZSWIM7*). Des nouveaux variants de certains de ces gènes ont été identifiés dans notre cohorte à savoir *STAG3*, *SPIDR*, *PSMC3IP*, *HFM1* et *FANCM*.

On peut donc s'attendre prochainement à la découverte d'autres gènes communs entre l'infertilité masculine et féminine, appartenant notamment à la famille des gènes de méiose et de la réparation de l'ADN. Ceci doit être pris en compte à la fois sur le plan clinique pour le conseil génétique de ces familles mais

également dans le cadre de la recherche de nouveaux gènes.

Table 4 : Gènes communs entre infertilité masculine et IOP identifiés à ce jour

Gène	Voie moléculaire	Héritabilité
AR	Récepteur aux Androgènes	Lié à l'X
C14orf39	Méiose	Récessive
FANCM	Voie Fanconi	Récessive
FBXO43	Recombinaison Homologue	Récessive
HFM1	Recombinaison Homologue	Récessive
MCM8	Recombinaison Homologue, MMR	Récessive
MEIOB	Méiose	Récessive
MSH4	MMR	Récessive
MSH5	MMR	Récessive
NR5A1	Développement des gonades	Dominant
PSMC3IP	Recombinaison Homologue	Récessive
REC8	Complexe Cohésine, Méiose	Récessive
SPATA22	Méiose	Récessive
SPIDR	Recombinaison Homologue	Récessive
STAG3	Cohésine	Récessive
WT1	Développement des gonades	Dominant
ZSWIM7	Recombinaison Homologue	Récessive

5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'IOP est une cause croissante d'infertilité féminine approchant les 4% des femmes avant 40 ans et constitue un problème de santé publique. Nous révélons au travers de ce travail de thèse qu'une cause génétique de cette affection est identifiable dans 29.3% des cas grâce à l'utilisation d'un panel de séquençage nouvelle génération-NGS ciblé. Trois grandes familles de gènes expliquent plus de 90% des étiologies génétiques de l'IOP à savoir les gènes de méiose et de réparation d'ADN, les gènes de la croissance folliculaire et les gènes du métabolisme ou de fonction mitochondriale. Onze nouveaux gènes ont été identifiés dont certains impliquent de nouvelles voies moléculaires pouvant correspondre à de potentielles cibles thérapeutiques dans le futur. Chez une patiente sur 12, l'IOP peut être le symptôme révélateur d'une maladie multi systémique affectant le métabolisme ou l'intégrité du génome dont l'anémie de Fanconi qui apparait comme une cause potentiellement croissante de l'IOP. Un travail commun et coordonné entre les sociétés savantes dans le domaine de la reproduction, la génétique et de l'oncogénétique devrait statuer sur l'étude moléculaire des gènes de réparation d'ADN dans l'IOP notamment ceux de la voie Fanconi y compris *BRCA1* et *BRCA2* puis d'établir des recommandations de suivi et de prise en charge.Le diagnostic génétique de toute IOP isolée sans cause identifiée est donc nécessaire au plus tôt une fois le diagnostic d'IOP établi. Hormis l'infertilité, c'est donc l'état de santé global des patientes qu'il faut évaluer et traiter, et ce en fonction de la cause qui doit impérativement être identifiée au préalable. La génétique peut donner également des indications sur la réserve ovarienne et donc sur le pronostic de fertilité en

fonction de la voie moléculaire altérée. Cette indication pronostique peut aider les patientes et les apparentées dans la planification du projet de grossesse mais peut permettre également d'améliorer le rendement des nouvelles techniques de maturation folliculaire *in vitro*, une technique prometteuse de traitement de l'infertilité dans l'IOP, non encore disponible en France. L'ensemble de ces données nous permet de proposer une médecine personnalisée avec un conseil génétique approprié des patientes et de leurs familles en fonction de l'étiologie identifiée. Nous pourrons améliorer le rendement diagnostique de la génétique dans l'IOP d'une part par l'étude du génome, notamment dans le cadre du plan France médecine génomique- PFMG, mais également par le développement de modèle *in vivo* ou *in vitro* pour la validation fonctionnelle des variants génétiques identifiés. Nous espérons que nos résultats permettront de revoir les pratiques actuelles et les recommandations des sociétés savantes dans le domaine de la reproduction et l'endocrinologie pour la prise en charge de l'IOP.

6 REFERENCES

Abel MH, Wootton AN, Wilkins V, Huhtaniemi I, Knight PG, Charlton HM. The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology* 2000;**141**:1795–1803.

Achermann JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet* 1999;**22**:125–126.

Ahonen P, Myllärniemi S, Sipilä I, Perheentupa J. Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients. *N Engl J Med* 1990;**322**:1829–1836.

Aittomäki K, Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, Kaskikari R, Sankila EM, Lehväslaiho H, Engel AR, *et al.* Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 1995;**82**:959–968.

Akbari A, Zoha Tabatabaei S, Salehi N, Padidar K, Almadani N, Ali Sadighi Gilani M, Mashayekhi M, Motevaseli E, Totonchi M. Novel STAG3 variant associated with primary ovarian insufficiency and non-obstructive azoospermia in an Iranian consanguineous family. *Gene* 2022;**821**:146281.

Akin L, Rizzoti K, Gregory LC, Corredor B, Le Quesne Stabej P, Williams H, Buonocore F, Mouilleron S, Capra V, McGlacken-Byrne SM, *et al.* Pathogenic variants in RNPC3 are associated with hypopituitarism and primary ovarian insufficiency. *Genetics in Medicine* 2022;**24**:384–397.

Al-Agha AE, Ahmed IA, Nuebel E, Moriwaki M, Moore B, Peacock KA, Mosbruger T, Neklason DW, Jorde LB, Yandell M, *et al.* Primary Ovarian Insufficiency and Azoospermia in Carriers of a Homozygous PSMC3IP Stop Gain Mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;**103**:555–563.

AlAsiri S, Basit S, Wood-Trageser MA, Yatsenko SA, Jeffries EP, Surti U, Ketterer DM, Afzal S, Ramzan K, Faiyaz-Ul Haque M, *et al.* Exome sequencing reveals MCM8 mutation underlies ovarian failure and chromosomal instability. *J Clin Invest* 2015;**125**:258–262.

Alazami AM, Al-Saif A, Al-Semari A, Bohlega S, Zlitni S, Alzahrani F, Bavi P, Kaya N, Colak D, Khalak H, *et al.* Mutations in C2orf37, encoding a nucleolar protein, cause hypogonadism, alopecia, diabetes mellitus, mental retardation, and extrapyramidal syndrome. *Am J Hum Genet* 2008;**83**:684–691.

Alemar B, Herzog J, Brinckmann Oliveira Netto C, Artigalás O, Schwartz IVD, Matzenbacher Bittar C, Ashton-Prolla P, Weitzel JN. Prevalence of Hispanic BRCA1 and BRCA2 mutations among hereditary breast and ovarian cancer patients from Brazil reveals differences among Latin American populations. *Cancer Genet* 2016;**209**:417–422.

Alhathal N, Maddirevula S, Coskun S, Alali H, Assoum M, Morris T, Deek HA, Hamed SA, Alsuhaibani S, Mirdawi A, *et al.* A genomics approach to male infertility. *Genet Med* 2020;**22**:1967–1975.

Alvarez-Mora MI, Todeschini A-L, Caburet S, Perets LP, Mila M, Younis JS, Shalev S, Veitia RA. An exome-wide exploration of cases of primary ovarian insufficiency uncovers novel sequence variants and candidate genes. *Clin Genet* 2020;**98**:293–298.

Ameziane N, May P, Haitjema A, Vrugt HJ van de, Rossum-Fikkert SE van, Ristic D, Williams GJ, Balk J, Rockx D, Li H, *et al.* A novel Fanconi anaemia subtype associated with a dominant-negative mutation in RAD51. *Nat Commun* 2015;**6**:8829.

Anagnostis P, Christou K, Artzouchaltzi A-M, Gkekas NK, Kosmidou N, Siolos P, Paschou SA, Potoupnis M, Kenanidis E, Tsiridis E, *et al.* Early menopause and premature ovarian insufficiency are associated with increased risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 2019a;**180**:41–50.

Anagnostis P, Siolos P, Gkekas NK, Kosmidou N, Artzouchaltzi A-M, Christou K, Paschou SA, Potoupnis M, Kenanidis E, Tsiridis E, *et al.* Association between age at menopause and fracture risk: a systematic review and meta-analysis. *Endocrine* 2019b;**63**:213–224.

Arai M, Yokoyama S, Watanabe C, Yoshida R, Kita M, Okawa M, Sakurai A, Sekine M, Yotsumoto J, Nomura H, *et al.* Genetic and clinical characteristics in Japanese hereditary breast and ovarian cancer: first report after establishment of HBOC registration system in Japan. *J Hum Genet* 2018;**63**:447–457.

Argente J, Flores R, Gutiérrez-Arumí A, Verma B, Martos-Moreno GÁ, Cuscó I, Oghabian A, Chowen JA, Frilander MJ, Pérez-Jurado LA. Defective minor spliceosome mRNA processing results in isolated familial growth hormone deficiency. *EMBO Mol Med* 2014;**6**:299–306.

Ates S, Yesil G, Sevket O, Molla T, Yildiz S. Comparison of metabolic profile and abdominal fat distribution between karyotypically normal women with premature ovarian insufficiency and age matched controls. *Maturitas* 2014;**79**:306–310.

Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res* 2009;**668**:4–10.

Bachelot A, Rouxel A, Massin N, Dulon J, Courtillot C, Matuchansky C, Badachi Y, Fortin A, Paniel B, Lecuru F, *et al.* Phenotyping and genetic studies of 357 consecutive patients presenting with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol* 2009;**161**:179–187.

Baker TG. A QUANTITATIVE AND CYTOLOGICAL STUDY OF GERM CELLS IN HUMAN OVARIES. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1963;**158**:417–433.

Beau I, Touraine P, Meduri G, Gougeon A, Desroches A, Matuchansky C, Milgrom E, Kuttenn F, Misrahi M. A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. *J Clin Invest* 1998;**102**:1352–1359.

Ben-Aharon I, Meizner I, Granot T, Uri S, Hasky N, Rizel S, Yerushalmi R, Sulkes A, Stemmer SM. Chemotherapy-induced ovarian failure as a prototype for acute vascular toxicity. *Oncologist* 2012;**17**:1386–1393.

Berry GT. Classic Galactosemia and Clinical Variant Galactosemia. In Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews*® [Internet] 1993; University of Washington, Seattle: Seattle (WA)Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1518/.

Betterle C, Greggio NA, Volpato M. Clinical review 93: Autoimmune polyglandular syndrome type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;**83**:1049–1055.

Bhaskaran SP, Chandratre K, Gupta H, Zhang L, Wang X, Cui J, Kim YC, Sinha S, Jiang L, Lu B, *et al.* Germline variation in BRCA1/2 is highly ethnic-specific: Evidence from over 30,000 Chinese hereditary breast and ovarian cancer patients. *Int J Cancer* 2019;**145**:962–973.

Bijl N van der, Röpke A, Biswas U, Wöste M, Jessberger R, Kliesch S, Friedrich C, Tüttelmann F. Mutations in the stromal antigen 3 (STAG3) gene cause male infertility due to meiotic arrest. *Hum Reprod* 2019;**34**:2112–2119.

Björses P, Halonen M, Palvimo JJ, Kolmer M, Aaltonen J, Ellonen P, Perheentupa J, Ulmanen I, Peltonen L. Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy protein. *Am J Hum Genet* 2000;**66**:378–392.

Blay P, Santamaría I, Pitiot AS, Luque M, Alvarado MG, Lastra A, Fernández Y, Paredes A, Freije JMP, Balbín M. Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast and ovarian cancer families from Asturias (Northern Spain). *BMC Cancer* 2013;**13**:243.

Blok MJ, Bosch BJ van den, Jongen E, Hendrickx A, Die-Smulders CE de, Hoogendijk JE, Brusse E, Visser M de, Poll-The BT, Bierau J, *et al.* The unfolding clinical spectrum of POLG mutations. *J Med Genet* 2009;**46**:776–785.

Bogliolo M, Pujol R, Aza-Carmona M, Muñoz-Subirana N, Rodriguez-Santiago B, Casado JA, Rio P, Bauser C, Reina-Castillón J, Lopez-Sanchez M, *et al.*

Optimised molecular genetic diagnostics of Fanconi anaemia by whole exome sequencing and functional studies. *J Med Genet* 2020;**57**:258–268.

Bolcun-Filas E, Hall E, Speed R, Taggart M, Grey C, Massy B de, Benavente R, Cooke HJ. Mutation of the mouse Syce1 gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLoS Genet* 2009;**5**:e1000393.

Bouali N, Francou B, Bouligand J, Imanci D, Dimassi S, Tosca L, Zaouali M, Mougou S, Young J, Saad A, *et al.* New MCM8 mutation associated with premature ovarian insufficiency and chromosomal instability in a highly consanguineous Tunisian family. *Fertil Steril* 2017;**108**:694–702.

Bouilly J, Bachelot A, Broutin I, Touraine P, Binart N. Novel NOBOX loss-of-function mutations account for 6.2% of cases in a large primary ovarian insufficiency cohort. *Hum Mutat* 2011;**32**:1108–1113.

Bouilly J, Beau I, Barraud S, Bernard V, Azibi K, Fagart J, Fèvre A, Todeschini AL, Veitia RA, Beldjord C, *et al.* Identification of Multiple Gene Mutations Accounts for a new Genetic Architecture of Primary Ovarian Insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;**101**:4541–4550.

Bruin C de, Mericq V, Andrew SF, Duyvenvoorde HA van, Verkaik NS, Losekoot M, Porollo A, Garcia H, Kuang Y, Hanson D, *et al.* An XRCC4 splice mutation associated with severe short stature, gonadal failure, and early-onset metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;**100**:E789-798.

Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, Harrison W, Vaiman D, Ben-Neriah Z, García-Tuñón I, *et al.* Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N Engl J Med* 2014;**370**:943–949.

Caburet S, Demarez A, Moumné L, Fellous M, De Baere E, Veitia RA. A recurrent polyalanine expansion in the transcription factor FOXL2 induces extensive nuclear and cytoplasmic protein aggregation. *J Med Genet* 2004;**41**:932–936.

Caburet S, Heddar A, Dardillac E, Creux H, Lambert M, Messiaen S, Tourpin S, Livera G, Lopez BS, Misrahi M. Homozygous hypomorphic BRCA2 variant in primary ovarian insufficiency without cancer or Fanconi anaemia trait. *J Med Genet* 2020a;.

Caburet S, Heddar A, Dardillac E, Creux H, Lambert M, Messiaen S, Tourpin S, Livera G, Lopez BS, Misrahi M. Homozygous hypomorphic BRCA2 variant in primary ovarian insufficiency without cancer or Fanconi anaemia trait. *J Med Genet* 2020b;.

Caburet S, Todeschini A-L, Petrillo C, Martini E, Farran ND, Legois B, Livera G, Younis JS, Shalev S, Veitia RA. A truncating MEIOB mutation responsible for familial primary ovarian insufficiency abolishes its interaction with its partner SPATA22 and their recruitment to DNA double-strand breaks. *EBioMedicine* 2019;**42**:524–531.

Calderon FRO, Phansalkar AR, Crockett DK, Miller M, Mao R. Mutation database for the galactose-1-phosphate uridyltransferase (GALT) gene. *Hum Mutat* 2007;**28**:939–943.

Canonico M, Plu-Bureau G, O'Sullivan MJ, Stefanick ML, Cochrane B, Scarabin P-Y, Manson JE. Age at menopause, reproductive history, and venous thromboembolism risk among postmenopausal women: the Women's Health Initiative Hormone Therapy clinical trials. *Menopause* 2014;**21**:214–220.

Carlosama C, Elzaiat M, Patiño LC, Mateus HE, Veitia RA, Laissue P. A homozygous donor splice-site mutation in the meiotic gene MSH4 causes primary ovarian insufficiency. *Hum Mol Genet* 2017;**26**:3161–3166.

Catomeris AJ, Ballios BG, Sangermano R, Wagner NE, Comander JI, Pierce EA, Place EM, Bujakowska KM, Huckfeldt RM. Novel RCBTB1 variants causing later-onset non-syndromic retinal dystrophy with macular chorioretinal atrophy. *Ophthalmic Genet* 2022;**43**:332–339.

Catucci I, Osorio A, Arver B, Neidhardt G, Bogliolo M, Zanardi F, Riboni M, Minardi S, Pujol R, Azzollini J, *et al.* Individuals with FANCM biallelic mutations do not develop Fanconi anemia, but show risk for breast cancer, chemotherapy toxicity and may display chromosome fragility. *Genet Med* 2018;**20**:452–457.

Cetani F, Barbesino G, Borsari S, Pardi E, Cianferotti L, Pinchera A, Marcocci C. A novel mutation of the autoimmune regulator gene in an Italian kindred with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy, acting in a dominant fashion and strongly cosegregating with hypothyroid autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**:4747–4752.

Chaganti RS, Schonberg S, German J. A manyfold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;**71**:4508–4512.

Chatzispyrou IA, Alders M, Guerrero-Castillo S, Zapata Perez R, Haagmans MA, Mouchiroud L, Koster J, Ofman R, Baas F, Waterham HR, *et al.* A homozygous missense mutation in ERAL1, encoding a mitochondrial rRNA chaperone, causes Perrault syndrome. *Hum Mol Genet* 2017;**26**:2541–2550.

Chen Z, Kang X, Wang L, Dong H, Wang C, Xiong Z, Zhao W, Jia C, Lin J, Zhang W, *et al.* Rictor/mTORC2 pathway in oocytes regulates folliculogenesis, and its inactivation causes premature ovarian failure. *J Biol Chem* 2015;**290**:6387–6396.

Chmara M, Wernstedt A, Wasag B, Peeters H, Renard M, Beert E, Brems H, Giner T, Bieber I, Hamm H, *et al.* Multiple pilomatricomas with somatic CTNNB1 mutations in children with constitutive mismatch repair deficiency. *Genes Chromosomes Cancer* 2013;**52**:656–664.

Chrzanowska KH, Szarras-Czapnik M, Gajdulewicz M, Kalina MA, Gajtko-Metera M, Walewska-Wolf M, Szufladowicz-Wozniak J, Rysiewski H, Gregorek H, Cukrowska B, *et al.* High prevalence of primary ovarian insufficiency in girls and young women with Nijmegen breakage syndrome: evidence from a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;**95**:3133–3140.

Chun HH, Gatti RA. Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair (Amst)* 2004;**3**:1187–1196.

Colombo R, Pontoglio A, Bini M. A STAG3 missense mutation in two sisters with primary ovarian insufficiency. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2017;**216**:269–271.

Conforti A, Tüttelmann F, Alviggi C, Behre HM, Fischer R, Hu L, Polyzos NP, Chuderland D, Rama Raju GA, D'Hooghe T, *et al.* Effect of Genetic Variants of Gonadotropins and Their Receptors on Ovarian Stimulation Outcomes: A Delphi Consensus. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;**12**:797365.

Coppieters F, Ascari G, Dannhausen K, Nikopoulos K, Peelman F, Karlstetter M, Xu M, Brachet C, Meunier I, Tsilimbaris MK, *et al.* Isolated and Syndromic

Retinal Dystrophy Caused by Biallelic Mutations in RCBTB1, a Gene Implicated in Ubiquitination. *Am J Hum Genet* 2016;**99**:470–480.

Cramer DW, Xu H, Harlow BL. Family history as a predictor of early menopause. *Fertil Steril* 1995;**64**:740–745.

Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, *et al.* The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 2001;**27**:159–166.

Day FR, Ruth KS, Thompson DJ, Lunetta KL, Pervjakova N, Chasman DI, Stolk L, Finucane HK, Sulem P, Bulik-Sullivan B, *et al.* Large-scale genomic analyses link reproductive aging to hypothalamic signaling, breast cancer susceptibility and BRCA1-mediated DNA repair. *Nat Genet* 2015;**47**:1294–1303.

De Baere E, Beysen D, Oley C, Lorenz B, Cocquet J, De Sutter P, Devriendt K, Dixon M, Fellous M, Fryns J-P, *et al.* FOXL2 and BPES: mutational hotspots, phenotypic variability, and revision of the genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 2003;**72**:478–487.

De Vos M, Devroey P, Fauser BCJM. Primary ovarian insufficiency. *Lancet* 2010;**376**:911–921.

Demain L a. M, Urquhart JE, O'Sullivan J, Williams SG, Bhaskar SS, Jenkinson EM, Lourenco CM, Heiberg A, Pearce SH, Shalev SA, *et al.* Expanding the genotypic spectrum of Perrault syndrome. *Clin Genet* 2017;**91**:302–312.

Demain LAM, Boetje E, Edgerley JJ, Miles E, Fitzgerald CT, Busby G, Beaman GM, O'Sullivan J, O'Keefe RT, Newman WG. Biallelic loss of function variants in STAG3 result in primary ovarian insufficiency. *Reprod Biomed Online* 2021;**43**:899–902.

Demirhan O, Türkmen S, Schwabe GC, Soyupak S, Akgül E, Tastemir D, Karahan D, Mundlos S, Lehmann K. A homozygous BMPR1B mutation causes a new subtype of acromesomelic chondrodysplasia with genital anomalies. *J Med Genet* 2005;**42**:314–317.

Desai S, Wood-Trageser M, Matic J, Chipkin J, Jiang H, Bachelot A, Dulon J, Sala C, Barbieri C, Cocca M, *et al.* MCM8 and MCM9 Nucleotide Variants in Women With Primary Ovarian Insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;**102**:576–582.

Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet* 2004;**75**:106–111.

Di-Battista A, Moysés-Oliveira M, Melaragno MI. Genetics of premature ovarian insufficiency and the association with X-autosome translocations. *Reproduction* 2020;**160**:R55–R64.

Díez O, Osorio A, Durán M, Martinez-Ferrandis JI, Hoya M de la, Salazar R, Vega A, Campos B, Rodríguez-López R, Velasco E, *et al.* Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Hum Mutat* 2003;**22**:301–312.

Do KA, Broom BM, Kuhnert P, Duffy DL, Todorov AA, Treloar SA, Martin NG. Genetic analysis of the age at menopause by using estimating equations and Bayesian random effects models. *Stat Med* 2000;**19**:1217–1235.

Domchek SM, Tang J, Stopfer J, Lilli DR, Hamel N, Tischkowitz M, Monteiro ANA, Messick TE, Powers J, Yonker A, *et al.* Biallelic deleterious BRCA1 mutations in a woman with early-onset ovarian cancer. *Cancer Discov* 2013;**3**:399–405.

Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonckt A, Demylle D, Dolmans M-M. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum Reprod Update* 2006;**12**:519–535.

Donovan FX, Solanki A, Mori M, Chavan N, George M, C SK, Okuno Y, Muramastsu H, Yoshida K, Shimamoto A, *et al.* A founder variant in the South Asian population leads to a high prevalence of FANCL Fanconi anemia cases in India. *Hum Mutat* 2020;**41**:122–128.

Dörk T, Bendix-Waltes R, Wegner R-D, Stumm M. Slow progression of ataxia-telangiectasia with double missense and in frame splice mutations. *Am J Med Genet A* 2004;**126A**:272–277.

Dumay A, Laulier C, Bertrand P, Saintigny Y, Lebrun F, Vayssière J-L, Lopez BS. Bax and Bid, two proapoptotic Bcl-2 family members, inhibit homologous recombination, independently of apoptosis regulation. *Oncogene* 2006;**25**:3196–3205.

Ellis NA, German J. Molecular genetics of Bloom's syndrome. *Hum Mol Genet* 1996;**5 Spec No**:1457–1463.

Elzaiat M, Todeschini A-L, Caburet S, Veitia RA. The genetic make-up of ovarian development and function: the focus on the transcription factor FOXL2. *Clin Genet* 2017;**91**:173–182.

Erven B van, Berry GT, Cassiman D, Connolly G, Forga M, Gautschi M, Gubbels CS, Hollak CEM, Janssen MC, Knerr I, *et al.* Fertility in adult women with classic galactosemia and primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril* 2017;**108**:168–174.

Eskenazi S, Bachelot A, Hugon-Rodin J, Plu-Bureau G, Gompel A, Catteau-Jonard S, Molina-Gomes D, Dewailly D, Dodé C, Christin-Maitre S, *et al.* Next Generation Sequencing Should Be Proposed to Every Woman With “Idiopathic” Primary Ovarian Insufficiency. *J Endocr Soc* 2021;**5**:bvab032.

European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI, Webber L, Davies M, Anderson R, Bartlett J, Braat D, Cartwright B, Cifkova R, Muinck Keizer-Schrama S de, Hogervorst E, *et al.* ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod* 2016;**31**:926–937.

Faridi R, Rea A, Fenollar-Ferrer C, O’Keefe RT, Gu S, Munir Z, Khan AA, Riazuddin S, Hoa M, Naz S, *et al.* New insights into Perrault syndrome, a clinically and genetically heterogeneous disorder. *Hum Genet* 2022;**141**:805–819.

Fauchereau F, Shalev S, Chervinsky E, Beck-Fruchter R, Legois B, Fellous M, Caburet S, Veitia RA. A non-sense MCM9 mutation in a familial case of primary ovarian insufficiency. *Clin Genet* 2016;**89**:603–607.

Felipe-Medina N, Caburet S, Sánchez-Sáez F, Condezo YB, Rooij DG de, Gómez-H L, Garcia-Valiente R, Todeschini AL, Duque P, Sánchez-Martin

MA, *et al.* A missense in HSF2BP causing primary ovarian insufficiency affects meiotic recombination by its novel interactor C19ORF57/BRME1. *Elife* 2020;**9**:.

Fernandes GC, Michelli RAD, Galvão HCR, Paula AE, Pereira R, Andrade CE, Felicio PS, Souza CP, Mendes DRP, Volc S, *et al.* Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. *Oncotarget* 2016;**7**:80465–80481.

Ferreira CR, Altassan R, Marques-Da-Silva D, Francisco R, Jaeken J, Morava E. Recognizable phenotypes in CDG. *J Inherit Metab Dis* 2018;**41**:541–553.

Fogli A, Rodriguez D, Eymard-Pierre E, Bouhour F, Labauge P, Meaney BF, Zeesman S, Kaneski CR, Schiffmann R, Boespflug-Tanguy O. Ovarian failure related to eukaryotic initiation factor 2B mutations. *Am J Hum Genet* 2003;**72**:1544–1550.

Foley AR, Zou Y, Dunford JE, Rooney J, Chandra G, Xiong H, Straub V, Voit T, Romero N, Donkervoort S, *et al.* GGPS1 Mutations Cause Muscular Dystrophy/Hearing Loss/Ovarian Insufficiency Syndrome. *Ann Neurol* 2020;**88**:332–347.

Fouquet B, Pawlikowska P, Caburet S, Guigon C, Mäkinen M, Tanner L, Hietala M, Urbanska K, Bellutti L, Legois B, *et al.* A homozygous FANCM mutation underlies a familial case of non-syndromic primary ovarian insufficiency. *Elife* 2017a;**6**:.

Fouquet B, Pawlikowska P, Caburet S, Guigon C, Mäkinen M, Tanner L, Hietala M, Urbanska K, Bellutti L, Legois B, *et al.* A homozygous FANCM mutation

underlies a familial case of non-syndromic primary ovarian insufficiency. *Elife* 2017b;**6**:.

Franca MM, Condezo YB, Elzaiat M, Felipe-Medina N, Sánchez-Sáez F, Muñoz S, Sainz-Urruela R, Martín-Hervás MR, García-Valiente R, Sánchez-Martín MA, *et al.* A truncating variant of RAD51B associated with primary ovarian insufficiency provides insights into its meiotic and somatic functions. *Cell Death Differ* 2022;

França MM, Funari MFA, Lerario AM, Nishi MY, Pita CC, Fontenele EGP, Mendonca BB. A novel homozygous 1-bp deletion in the NOBOX gene in two Brazilian sisters with primary ovarian failure. *Endocrine* 2017;**58**:442–447.

França MM, Funari MFA, Lerario AM, Santos MG, Nishi MY, Domenice S, Moraes DR, Costalonga EF, Maciel GAR, Maciel-Guerra AT, *et al.* Screening of targeted panel genes in Brazilian patients with primary ovarian insufficiency. *PLoS One* 2020;**15**:e0240795.

França MM, Nishi MY, Funari MFA, Lerario AM, Baracat EC, Hayashida SAY, Maciel GAR, Jorge AAL, Mendonca BB. Two rare loss-of-function variants in the STAG3 gene leading to primary ovarian insufficiency. *Eur J Med Genet* 2019;**62**:186–189.

Freire BL, Homma TK, Funari MFA, Lerario AM, Leal AM, Velloso EDRP, Malaquias AC, Jorge AAL. Homozygous loss of function BRCA1 variant causing a Fanconi-anemia-like phenotype, a clinical report and review of previous patients. *Eur J Med Genet* 2018;**61**:130–133.

Fridman H, Yntema HG, Mägi R, Andreson R, Metspalu A, Mezzavila M, Tyler-Smith C, Xue Y, Carmi S, Levy-Lahad E, *et al.* The landscape of autosomal-recessive pathogenic variants in European populations reveals phenotype-specific effects. *Am J Hum Genet* 2021;**108**:608–619.

Fridovich-Keil JL, Berry GT. Pathophysiology of long-term complications in classic galactosemia: What we do and do not know. *Molecular Genetics and Metabolism* 2022;**137**:33–39.

Gajbhiye R, Fung JN, Montgomery GW. Complex genetics of female fertility. *NPJ Genom Med* 2018;**3**:29.

García-de Teresa B, Hernández-Gómez M, Frías S. DNA Damage as a Driver for Growth Delay: Chromosome Instability Syndromes with Intrauterine Growth Retardation. *Biomed Res Int* 2017;**2017**:8193892.

Georgakis MK, Beskou-Kontou T, Theodoridis I, Skalkidou A, Petridou ETh. Surgical menopause in association with cognitive function and risk of dementia: A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 2019;**106**:9–19.

Gianni P, Matenoglou E, Geropoulos G, Agrawal N, Adnani H, Zafeiropoulos S, Miyara SJ, Guevara S, Mumford JM, Molmenti EP, *et al.* The Fanconi anemia pathway and Breast Cancer: A comprehensive review of clinical data. *Clin Breast Cancer* 2022;**22**:10–25.

Girerd B, Coulet F, Jaïs X, Eyries M, Van Der Bruggen C, De Man F, Houweling A, Dorfmüller P, Savale L, Sitbon O, *et al.* Characteristics of pulmonary arterial hypertension in affected carriers of a mutation located in the cytoplasmic tail

of bone morphogenetic protein receptor type 2. *Chest* 2015;**147**:1385–1394.

Girerd B, Montani D, Jaïs X, Eyries M, Yaici A, Sztrymf B, Savale L, Parent F, Coulet F, Godinas L, *et al.* Genetic counselling in a national referral centre for pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2016;**47**:541–552.

Giri N, Batista DL, Alter BP, Stratakis CA. Endocrine abnormalities in patients with Fanconi anemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;**92**:2624–2631.

Goldberg Y, Aleme O, Peled-Perets L, Castellvi-Bel S, Nielsen M, Shalev SA. MCM9 is associated with germline predisposition to early-onset cancer-clinical evidence. *NPJ Genom Med* 2021;**6**:78.

Goldberg Y, Halpern N, Hubert A, Adler SN, Cohen S, Plesser-Duvdevani M, Pappo O, Shaag A, Meiner V. Mutated MCM9 is associated with predisposition to hereditary mixed polyposis and colorectal cancer in addition to primary ovarian failure. *Cancer Genet* 2015;**208**:621–624.

Goldfarb Y, Givony T, Kadouri N, Dobeš J, Peligero-Cruz C, Zalayat I, Damari G, Dassa B, Ben-Dor S, Gruper Y, *et al.* Mechanistic dissection of dominant AIRE mutations in mouse models reveals AIRE autoregulation. *J Exp Med* 2021;**218**:e20201076.

Golezar S, Ramezani Tehrani F, Khazaei S, Ebadi A, Keshavarz Z. The global prevalence of primary ovarian insufficiency and early menopause: a meta-analysis. *Climacteric* 2019;**22**:403–411.

Golubicki M, Bonjoch L, Acuña-Ochoa JG, Díaz-Gay M, Muñoz J, Cuatrecasas M, Ocaña T, Iseas S, Mendez G, Cisterna D, *et al.* Germline biallelic Mcm8 variants are associated with early-onset Lynch-like syndrome. *JCI Insight* 2020;**5**:140698.

Gómez-Rojas S, Aristizábal-Duque JE, Muñoz-Fernández LF, Sarmiento-Ramón MP, Pereira-Gómez MDP. New STAG3 gene variant as a cause of premature ovarian insufficiency. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2022;**73**:142–148.

Gong Y, Krakow D, Marcelino J, Wilkin D, Chitayat D, Babul-Hirji R, Hudgins L, Cremers CW, Cremers FP, Brunner HG, *et al.* Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis. *Nat Genet* 1999;**21**:302–304.

Gorsi B, Hernandez E, Moore MB, Moriwaki M, Chow CY, Coelho E, Taylor E, Lu C, Walker A, Touraine P, *et al.* Causal and Candidate Gene Variants in a Large Cohort of Women with Primary Ovarian Insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2021;dgab775.

Gosden RG, Treloar SA, Martin NG, Cherkas LF, Spector TD, Faddy MJ, Silber SJ. Prevalence of premature ovarian failure in monozygotic and dizygotic twins. *Hum Reprod* 2007;**22**:610–615.

Grosbois J, Devos M, Demeestere I. Implications of Nonphysiological Ovarian Primordial Follicle Activation for Fertility Preservation. *Endocr Rev* 2020;**41**:bnaa020.

Grunewald S, Matthijs G, Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation: a review. *Pediatr Res* 2002;**52**:618–624.

Grynberg M, Peltoketo H, Christin-Maître S, Poulain M, Bouchard P, Fanchin R. First birth achieved after in vitro maturation of oocytes from a woman endowed with multiple antral follicles unresponsive to follicle-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;**98**:4493–4498.

Gunning MN, Meun C, Rijn BB van, Daan NMP, Roeters van Lennep JE, Appelman Y, Boersma E, Hofstra L, Fauser CGKM, Rueda-Ochoa OL, *et al.* The cardiovascular risk profile of middle age women previously diagnosed with premature ovarian insufficiency: A case-control study. *PLoS One* 2020;**15**:e0229576.

Gunning MN, Meun C, Rijn BB van, Maas AHEM, Benschop L, Franx A, Boersma E, Budde RPJ, Appelman Y, Lambalk CB, *et al.* Coronary artery calcification in middle-aged women with premature ovarian insufficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2019;**91**:314–322.

Guo T, Zhao S, Zhao S, Chen M, Li G, Jiao X, Wang Z, Zhao Y, Qin Y, Gao F, *et al.* Mutations in MSH5 in primary ovarian insufficiency. *Hum Mol Genet* 2017;**26**:1452–1457.

Hagen-Lillevik S, Rushing JS, Appiah L, Longo N, Andrews A, Lai K, Johnson J. Pathophysiology and management of classic galactosemic primary ovarian insufficiency. *Reprod Fertil* 2021;**2**:R67–R84.

Hamid R, Cogan JD, Hedges LK, Austin E, Phillips JA, Newman JH, Loyd JE. Penetrance of pulmonary arterial hypertension is modulated by the expression of normal BMPR2 allele. *Hum Mutat* 2009;**30**:649–654.

Harris SE, Chand AL, Winship IM, Gersak K, Aittomäki K, Shelling AN. Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* 2002;**8**:729–733.

Hartford SA, Luo Y, Southard TL, Min IM, Lis JT, Schimenti JC. Minichromosome maintenance helicase paralog MCM9 is dispensible for DNA replication but functions in germ-line stem cells and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;**108**:17702–17707.

He C, Kraft P, Chen C, Buring JE, Paré G, Hankinson SE, Chanock SJ, Ridker PM, Hunter DJ, Chasman DI. Genome-wide association studies identify loci associated with age at menarche and age at natural menopause. *Nat Genet* 2009;**41**:724–728.

He W-B, Banerjee S, Meng L-L, Du J, Gong F, Huang H, Zhang X-X, Wang Y-Y, Lu G-X, Lin G, *et al.* Whole-exome sequencing identifies a homozygous donor splice-site mutation in STAG3 that causes primary ovarian insufficiency. *Clin Genet* 2018a;**93**:340–344.

He W-B, Tu C-F, Liu Q, Meng L-L, Yuan S-M, Luo A-X, He F-S, Shen J, Li W, Du J, *et al.* DMC1 mutation that causes human non-obstructive azoospermia and premature ovarian insufficiency identified by whole-exome sequencing. *Journal of Medical Genetics* 2018b;**55**:198–204.

Heddar A, Beckers D, Fouquet B, Roland D, Misrahi M. A Novel Phenotype Combining Primary Ovarian Insufficiency Growth Retardation and Pilomatricomas With MCM8 Mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2020a;**105**:.

Heddar A, Beckers D, Fouquet B, Roland D, Misrahi M. A novel phenotype combining primary ovarian insufficiency growth retardation and pilomatricomas with MCM8 mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2020b;.

Heddar A, Dessen P, Flatters D, Misrahi M. Novel STAG3 mutations in a Caucasian family with primary ovarian insufficiency. *Mol Genet Genomics* 2019a;.

Heddar A, Dessen P, Flatters D, Misrahi M. Novel STAG3 mutations in a Caucasian family with primary ovarian insufficiency. *Mol Genet Genomics* 2019b;**294**:1527–1534.

Heddar A, Guichoux N, Auger N, Misrahi M. A SPIDR homozygous nonsense pathogenic variant in isolated primary ovarian insufficiency with chromosomal instability. *Clin Genet* 2022a;**101**:242–246.

Heddar A, Misrahi M. Should FANCL heterozygous pathogenic variants be considered as potentially causative of primary ovarian insufficiency? *Hum Mutat* 2020;**41**:1697–1699.

Heddar A, Misrahi M. Concerns regarding the potentially causal role of FANCA heterozygous variants in human primary ovarian insufficiency. *Hum Genet* 2021;**140**:691–694.

Heddar A, Misrahi M. Genetics of primary ovarian insufficiency: a careful step-by-step approach based on solid foundations to bring new knowledge. *Fertil Steril* 2022;**118**:421–424.

Heddar A, Ogur C, Da Costa S, Braham I, Billaud-Rist L, Findlinki N, Beneteau C, Reynaud R, Mahmoud K, Legrand S, *et al.* Genetic landscape of a large cohort of Primary Ovarian Insufficiency: New genes and pathways and implications for personalized medicine. *EBioMedicine* 2022b;**84**:104246.

Hernández-López D, Geisinger A, Trovero MF, Santiñaque FF, Brauer M, Folle GA, Benavente R, Rodríguez-Casuriaga R. Familial primary ovarian insufficiency associated with an SYCE1 point mutation: defective meiosis elucidated in humanized mice. *Mol Hum Reprod* 2020;**26**:485–497.

Hikmat O, Tzoulis C, Chong WK, Chentouf L, Klingenberg C, Fratter C, Carr LJ, Prabhakar P, Kumaraguru N, Gissen P, *et al.* The clinical spectrum and natural history of early-onset diseases due to DNA polymerase gamma mutations. *Genet Med* 2017;**19**:1217–1225.

Hochberg I, Demain LAM, Richer J, Thompson K, Urquhart JE, Rea A, Pagarkar W, Rodríguez-Palmero A, Schlüter A, Verdura E, *et al.* Bi-allelic variants in the mitochondrial RNase P subunit PRORP cause mitochondrial tRNA processing defects and pleiotropic multisystem presentations. *Am J Hum Genet* 2021;**108**:2195–2204.

Hoeijmakers JHJ. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 2009;**361**:1475–1485.

Honigberg MC, Zekavat SM, Aragam K, Finneran P, Klarin D, Bhatt DL, Januzzi JL, Scott NS, Natarajan P. Association of Premature Natural and Surgical Menopause With Incident Cardiovascular Disease. *JAMA* 2019;**322**:2411.

Hook EB, Warburton D. Turner syndrome revisited: review of new data supports the hypothesis that all viable 45,X cases are cryptic mosaics with a rescue cell line, implying an origin by mitotic loss. *Hum Genet* 2014;**133**:417–424.

Hopkins J, Hwang G, Jacob J, Sapp N, Bedigian R, Oka K, Overbeek P, Murray S, Jordan PW. Meiosis-specific cohesin component, Stag3 is essential for maintaining centromere chromatid cohesion, and required for DNA repair

and synapsis between homologous chromosomes. *PLoS Genet* 2014;**10**:e1004413.

Hou D, Yao C, Xu B, Luo W, Ke H, Li Z, Qin Y, Guo T. Variations of C14ORF39 and SYCE1 Identified in Idiopathic Premature Ovarian Insufficiency and Non-nobstructive Azoospermia. *J Clin Endocrinol Metab* 2022;**107**:724–734.

Hoya M de la, Pérez-Segura P, Van Orsouw N, Díaz-Rubio E, Caldés T. Spanish family study on hereditary breast and/or ovarian cancer: analysis of the BRCA1 gene. *Int J Cancer* 2001;**91**:137–140.

Huang K, Dang Y, Zhang P, Shen C, Sui X, Xia G, Qin Y, Jiao X, Wang C, Huo R, *et al.* CAV1 regulates primordial follicle formation via the Notch2 signalling pathway and is associated with premature ovarian insufficiency in humans. *Hum Reprod* 2018;**33**:2087–2095.

Huang Z, Zhang D, Thompson JA, Jamuar SS, Roshandel D, Jennings L, Mellough C, Charng J, Chen S-C, McLaren TL, *et al.* Deep clinical phenotyping and gene expression analysis in a patient with RCBTB1-associated retinopathy. *Ophthalmic Genet* 2021;**42**:266–275.

Hudson DF, Amor DJ, Boys A, Butler K, Williams L, Zhang T, Kalitsis P. Loss of RMI2 Increases Genome Instability and Causes a Bloom-Like Syndrome. *PLoS Genet* 2016;**12**:e1006483.

Hudson G, Schaefer AM, Taylor RW, Tiangyou W, Gibson A, Venables G, Griffiths P, Burn DJ, Turnbull DM, Chinnery PF. Mutation of the linker region of the polymerase gamma-1 (POLG1) gene associated with progressive external ophthalmoplegia and Parkinsonism. *Arch Neurol* 2007;**64**:553–557.

Huhtaniemi I, Hovatta O, La Marca A, Livera G, Monniaux D, Persani L, Heddar A, Jarzabek K, Laisk-Podar T, Salumets A, *et al.* Advances in the Molecular Pathophysiology, Genetics, and Treatment of Primary Ovarian Insufficiency. *Trends Endocrinol Metab* 2018a;**29**:400–419.

Huhtaniemi I, Hovatta O, La Marca A, Livera G, Monniaux D, Persani L, Heddar A, Jarzabek K, Laisk-Podar T, Salumets A, *et al.* Advances in the Molecular Pathophysiology, Genetics, and Treatment of Primary Ovarian Insufficiency. *Trends Endocrinol Metab* 2018b;**29**:400–419.

Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Hatzirodos N, Bonner W, Sabatier L, Reinhardt DP, Sado Y, Ninomiya Y, Wilhelm D, Rodgers RJ. A new model of development of the mammalian ovary and follicles. *PLoS One* 2013;**8**:e55578.

Husebye ES, Anderson MS, Kämpe O. Autoimmune Polyendocrine Syndromes. *N Engl J Med* 2018;**378**:1132–1141.

Innan H, Vaiman D, Veitia RA. Predictable increase in female reproductive window: A simple model connecting age of reproduction, menopause, and longevity. *Bioessays* 2021;**43**:e2000233.

InterLACE Study Team. Variations in reproductive events across life: a pooled analysis of data from 505 147 women across 10 countries. *Hum Reprod* 2019;**34**:881–893.

Jaganathan K, Kyriazopoulou Panagiotopoulou S, McRae JF, Darbandi SF, Knowles D, Li YI, Kosmicki JA, Arbelaez J, Cui W, Schwartz GB, *et al.* Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell* 2019;**176**:535-548.e24.

Jaillard S, McElreavy K, Robevska G, Akloul L, Ghieh F, Sreenivasan R, Beaumont M, Bashamboo A, Bignon-Topalovic J, Neyroud A-S, *et al.* STAG3 homozygous missense variant causes primary ovarian insufficiency and male non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 2020;**26**:665–677.

Jamieson S, Butzow R, Andersson N, Alexiadis M, Unkila-Kallio L, Heikinheimo M, Fuller PJ, Anttonen M. The FOXL2 C134W mutation is characteristic of adult granulosa cell tumors of the ovary. *Mod Pathol* 2010;**23**:1477–1485.

Jasperson KW, Samowitz WS, Burt RW. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome presenting as colonic adenomatous polyposis: clues from the skin. *Clin Genet* 2011;**80**:394–397.

Jenkinson EM, Clayton-Smith J, Mehta S, Bennett C, Reardon W, Green A, Pearce SHS, De Michele G, Conway GS, Cilliers D, *et al.* Perrault syndrome: further evidence for genetic heterogeneity. *J Neurol* 2012;**259**:974–976.

Jenkinson EM, Rehman AU, Walsh T, Clayton-Smith J, Lee K, Morell RJ, Drummond MC, Khan SN, Naeem MA, Rauf B, *et al.* Perrault syndrome is caused by recessive mutations in CLPP, encoding a mitochondrial ATP-dependent chambered protease. *Am J Hum Genet* 2013;**92**:605–613.

Jiao S-Y, Yang Y-H, Chen S-R. Molecular genetics of infertility: loss-of-function mutations in humans and corresponding knockout/mutated mice. *Hum Reprod Update* 2021;**27**:154–189.

Jin H, Lee B, Luo Y, Choi Y, Choi E-H, Jin H, Kim K-B, Seo SB, Kim Y-H, Lee HH, *et al.* FOXL2 directs DNA double-strand break repair pathways by differentially interacting with Ku. *Nat Commun* 2020;**11**:2010.

Jolly A, Bayram Y, Turan S, Aycan Z, Tos T, Abali ZY, Hacihamdioglu B, Coban Akdemir ZH, Hijazi H, Bas S, *et al.* Exome Sequencing of a Primary Ovarian Insufficiency Cohort Reveals Common Molecular Etiologies for a Spectrum of Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;**104**:3049–3067.

Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, Fishel-Bartal M, Ligumsky H, Paglin S, Wolf I, Kanety H, Sredni B, Meirow D. Cyclophosphamide triggers follicle activation and “burnout”; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. *Sci Transl Med* 2013;**5**:185ra62.

Kasak L, Punab M, Nagirnaja L, Grigorova M, Minajeva A, Lopes AM, Punab AM, Aston KI, Carvalho F, Laasik E, *et al.* Bi-allelic Recessive Loss-of-Function Variants in FANCM Cause Non-obstructive Azoospermia. *Am J Hum Genet* 2018;**103**:200–212.

Kato Y, Iwamori T, Ninomiya Y, Kohda T, Miyashita J, Sato M, Saga Y. ELAVL2-directed RNA regulatory network drives the formation of quiescent primordial follicles. *EMBO Rep* 2019;**20**:e48251.

Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho C, Kawamura N, Tamura M, Hashimoto S, *et al.* Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;**110**:17474–17479.

Keupp K, Hampp S, Hübbel A, Maringa M, Kostezka S, Rhiem K, Waha A, Wappenschmidt B, Pujol R, Surrallés J, *et al.* Biallelic germline BRCA1 mutations in a patient with early onset breast cancer, mild Fanconi anemia-like phenotype, and no chromosome fragility. *Mol Genet Genomic Med* 2019;**7**:e863.

Kherraf Z-E, Cazin C, Bouker A, Fourati Ben Mustapha S, Hennebicq S, Septier A, Coutton C, Raymond L, Nouchy M, Thierry-Mieg N, *et al.* Whole-exome sequencing improves the diagnosis and care of men with non-obstructive azoospermia. *Am J Hum Genet* 2022;**109**:508–517.

Kirshenbaum M, Orvieto R. Premature ovarian insufficiency (POI) and autoimmunity-an update appraisal. *J Assist Reprod Genet* 2019;**36**:2207–2215.

Kitao S, Shimamoto A, Goto M, Miller RW, Smithson WA, Lindor NM, Furuichi Y. Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. *Nat Genet* 1999;**22**:82–84.

Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, Massouras A. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics* 2019;**35**:1978–1980.

Kosaki K, Sato S, Hasegawa T, Matsuo N, Suzuki T, Ogata T. Premature ovarian failure in a female with proximal symphalangism and Noggin mutation. *Fertil Steril* 2004;**81**:1137–1139.

Krausz C, Riera-Escamilla A, Chianese C, Moreno-Mendoza D, Ars E, Rajmil O, Pujol R, Bogliolo M, Blanco I, Rodríguez I, *et al.* From exome analysis in idiopathic azoospermia to the identification of a high-risk subgroup for occult Fanconi anemia. *Genet Med* 2019;**21**:189–194.

Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips K-A, Mooij TM, Roos-Blom M-J, Jervis S, Leeuwen FE van, Milne RL, Andrieu N, *et al.* Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA* 2017;**317**:2402–2416.

Kwong A, Ho CYS, Shin VY, Au CH, Chan TL, Ma ESK. A Case Report of Germline Compound Heterozygous Mutations in the BRCA1 Gene of an Ovarian and Breast Cancer Patient. *Int J Mol Sci* 2021;**22**:E889.

Kwong A, Ng EKO, Wong CLP, Law FBF, Au T, Wong HN, Kurian AW, West DW, Ford JM, Ma ESK. Identification of BRCA1/2 founder mutations in Southern Chinese breast cancer patients using gene sequencing and high resolution DNA melting analysis. *PLoS One* 2012;**7**:e43994.

Lagergren K, Hammar M, Nedstrand E, Bladh M, Sydsjö G. The prevalence of primary ovarian insufficiency in Sweden; a national register study. *BMC Womens Health* 2018;**18**:175.

Laissue P, Lakhal B, Benayoun BA, Dipietromaria A, Braham R, Elghezal H, Philibert P, Saâd A, Sultan C, Fellous M, *et al.* Functional evidence implicating FOXL2 in non-syndromic premature ovarian failure and in the regulation of the transcription factor OSR2. *J Med Genet* 2009;**46**:455–457.

Lambert S, Lopez BS. Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non-lethal dominant-negative forms. *EMBO J* 2000;**19**:3090–3099.

Lambrinoudaki I, Paschou SA, Lumsden MA, Faubion S, Makrakis E, Kalantaridou S, Panay N. Premature ovarian insufficiency: A toolkit for the primary care physician. *Maturitas* 2021;**147**:53–63.

Laven JSE, Visser JA, Uitterlinden AG, Vermeij WP, Hoeijmakers JHJ. Menopause: Genome stability as new paradigm. *Maturitas* 2016;**92**:15–23.

Le Quesne Stabej P, Williams HJ, James C, Tekman M, Stanescu HC, Kleta R, Ocaka L, Lescai F, Storr HL, Bitner-Glindzicz M, *et al.* STAG3 truncating

variant as the cause of primary ovarian insufficiency. *Eur J Hum Genet* 2016;**24**:135–138.

Lee KY, Im J-S, Shibata E, Park J, Handa N, Kowalczykowski SC, Dutta A. MCM8-9 complex promotes resection of double-strand break ends by MRE11-RAD50-NBS1 complex. *Nat Commun* 2015;**6**:7744.

Lee PJ, Lilburn M, Wendel U, Schadewaldt P. A woman with untreated galactosaemia. *Lancet* 2003;**362**:446.

Lehmann K, Seemann P, Stricker S, Sammar M, Meyer B, Süring K, Majewski F, Tinschert S, Grzeschik K-H, Müller D, *et al.* Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:12277–12282.

Lerat J, Jonard L, Loundon N, Christin-Maitre S, Lacombe D, Goizet C, Rouzier C, Van Maldergem L, Gherbi S, Garabedian E-N, *et al.* An Application of NGS for Molecular Investigations in Perrault Syndrome: Study of 14 Families and Review of the Literature. *Hum Mutat* 2016;**37**:1354–1362.

Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Liu S, Duan E-K, Hsueh AJW. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**:10280–10284.

Li J-Y, Jing R, Wei H, Wang M, Xiaowei Q, Liu H, Jian L, Ou J-H, Jiang W-H, Tian F-G, *et al.* Germline mutations in 40 cancer susceptibility genes among Chinese patients with high hereditary risk breast cancer. *Int J Cancer* 2019;**144**:281–289.

Li Q, Engebrecht J. BRCA1 and BRCA2 Tumor Suppressor Function in Meiosis. *Front Cell Dev Biol* 2021;**9**:668309.

Li Q, Wang K. InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *Am J Hum Genet* 2017;**100**:267–280.

Liu W, Gao X, Zhang H, Liu R, Cao Y, Yu R, Fang G, Ma J, Zhao S. Analysis of STAG3 variants in Chinese non-obstructive azoospermia patients with germ cell maturation arrest. *Sci Rep* 2021;**11**:10077.

Liu X, Wu C, Li C, Boerwinkle E. dbNSFP v3.0: A One-Stop Database of Functional Predictions and Annotations for Human Nonsynonymous and Splice-Site SNVs. *Hum Mutat* 2016;**37**:235–241.

Liu Y, West SC. More complexity to the Bloom's syndrome complex. *Genes Dev* 2008;**22**:2737–2742.

Livadas S, Xekouki P, Kafiri G, Voutetakis A, Maniati-Christidi M, Dacou-Voutetakis C. Spontaneous pregnancy and birth of a normal female from a woman with Turner syndrome and elevated gonadotropins. *Fertil Steril* 2005;**83**:769–772.

Llort G, Muñoz CY, Tuser MP, Guillermo IB, Lluch JRG, Bale AE, Franco MA. Low frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Spain. *Hum Mutat* 2002;**19**:307.

Lourenço D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, Weryha G, Muresan M, Boudjenah R, Guerra-Junior G, Maciel-Guerra AT, Achermann JC, *et al.* Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med* 2009;**360**:1200–1210.

Luborsky JL, Meyer P, Sowers MF, Gold EB, Santoro N. Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Hum Reprod* 2003;**18**:199–206.

Ludwig T, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A. Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of Brca1, Brca2, Brca1/Brca2, Brca1/p53, and Brca2/p53 nullizygous embryos. *Genes Dev* 1997;**11**:1226–1241.

Luo X, Xu J, Zhao R, Qin J, Wang X, Yan Y, Wang L-J, Wang G, Yang X. The Role of Inactivated NF-κB in Premature Ovarian Failure. *Am J Pathol* 2022;**192**:468–483.

Luoma P, Melberg A, Rinne JO, Kaukonen JA, Nupponen NN, Chalmers RM, Oldfors A, Rautakorpi I, Peltonen L, Majamaa K, *et al.* Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet* 2004;**364**:875–882.

Lutzmann M, Grey C, Traver S, Ganier O, Maya-Mendoza A, Ranisavljevic N, Bernex F, Nishiyama A, Montel N, Gavois E, *et al.* MCM8- and MCM9-deficient mice reveal gametogenesis defects and genome instability due to impaired homologous recombination. *Mol Cell* 2012;**47**:523–534.

Maclaran K, Panay N. Current concepts in premature ovarian insufficiency. *Womens Health (Lond)* 2015;**11**:169–182.

Maiorano D, Lutzmann M, Méchali M. MCM proteins and DNA replication. *Curr Opin Cell Biol* 2006;**18**:130–136.

Maistro S, Teixeira N, Encinas G, Katayama MLH, Niewiadonski VDT, Cabral LG, Ribeiro RM, Gaburo Junior N, Gouvêa ACRC de, Carraro DM, *et al.* Germline mutations in BRCA1 and BRCA2 in epithelial ovarian cancer patients in Brazil. *BMC Cancer* 2016;**16**:934.

Mancuso M, Filosto M, Oh SJ, DiMauro S. A novel polymerase gamma mutation in a family with ophthalmoplegia, neuropathy, and Parkinsonism. *Arch Neurol* 2004;**61**:1777–1779.

Martin C-A, Sarlós K, Logan CV, Thakur RS, Parry DA, Bizard AH, Leitch A, Cleal L, Ali NS, Al-Owain MA, *et al.* Mutations in TOP3A Cause a Bloom Syndrome-like Disorder. *Am J Hum Genet* 2018;**103**:221–231.

Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med* 2012;**9**:e1001356.

Massin N, Méduri G, Bachelot A, Misrahi M, Kuttenn F, Touraine P. Evaluation of different markers of the ovarian reserve in patients presenting with premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol* 2008;**282**:95–100.

Matos-Rodrigues G, Martini E, Lopez BS. Mouse Models for Deciphering the Impact of Homologous Recombination on Tumorigenesis. *Cancers (Basel)* 2021;**13**:2083.

Matthijs G, Schollen E, Pardon E, Veiga-Da-Cunha M, Jaeken J, Cassiman JJ, Van Schaftingen E. Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). *Nat Genet* 1997;**16**:88–92.

Mauduit O, Brulard C, Lesluyes T, Delcroix V, Pérot G, Choublier N, Michaud M, Baud J, Lagarde P, Aurias A, *et al.* RCBTB1 Deletion Is Associated with Metastatic Outcome and Contributes to Docetaxel Resistance in Nontranslocation-Related Pleomorphic Sarcomas. *Cancers (Basel)* 2019;**11**:E81.

Mayer A, Fouquet B, Pugeat M, Misrahi M. BMP15 “knockout-like” effect in familial premature ovarian insufficiency with persistent ovarian reserve. *Clin Genet* 2017;**92**:208–212.

McGrath IM, Mortlock S, Montgomery GW. Genetic Regulation of Physiological Reproductive Lifespan and Female Fertility. *IJMS* 2021;**22**:2556.

McPherson E, Turner L, Zador I, Reynolds K, Macgregor D, Giampietro PF. Ovarian failure and dilated cardiomyopathy due to a novel lamin mutation. *Am J Med Genet A* 2009;**149A**:567–572.

Meduri G, Touraine P, Beau I, Lahuna O, Desroches A, Vacher-Lavenu MC, Kuttenn F, Misrahi M. Delayed puberty and primary amenorrhea associated with a novel mutation of the human follicle-stimulating hormone receptor: clinical, histological, and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**:3491–3498.

Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, Rooimans MA, Bier P, Hoatlin M, Pals G, *et al.* X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet* 2004;**36**:1219–1224.

Mellone S, Zavattaro M, Vurchio D, Ronzani S, Caputo M, Leone I, Prodam F, Giordano M. A Long Contiguous Stretch of Homozygosity Disclosed a Novel STAG3 Biallelic Pathogenic Variant Causing Primary Ovarian Insufficiency: A Case Report and Review of the Literature. *Genes (Basel)* 2021;**12**:1709.

Mesman RLS, Calléja FMGR, Hendriks G, Morolli B, Misovic B, Devilee P, Asperen CJ van, Vrieling H, Vreeswijk MPG. The functional impact of variants of uncertain significance in BRCA2. *Genet Med* 2019;**21**:293–302.

Meyer S, Tischkowitz M, Chandler K, Gillespie A, Birch JM, Evans DG. Fanconi anaemia, BRCA2 mutations and childhood cancer: a developmental perspective from clinical and epidemiological observations with implications for genetic counselling. *J Med Genet* 2014;**51**:71–75.

Miller BS, Freeze HH. New disorders in carbohydrate metabolism: congenital disorders of glycosylation and their impact on the endocrine system. *Rev Endocr Metab Disord* 2003;**4**:103–113.

Mishra GD, Pandeya N, Dobson AJ, Chung H-F, Anderson D, Kuh D, Sandin S, Giles GG, Bruinsma F, Hayashi K, *et al.* Early menarche, nulliparity and the risk for premature and early natural menopause. *Hum Reprod* 2017;**32**:679–686.

Mondul AM, Rodriguez C, Jacobs EJ, Calle EE. Age at natural menopause and cause-specific mortality. *Am J Epidemiol* 2005;**162**:1089–1097.

Morino H, Pierce SB, Matsuda Y, Walsh T, Ohsawa R, Newby M, Hiraki-Kamon K, Kuramochi M, Lee MK, Klevit RE, *et al.* Mutations in Twinkle primase-helicase cause Perrault syndrome with neurologic features. *Neurology* 2014;**83**:2054–2061.

Morrell NW, Aldred MA, Chung WK, Elliott CG, Nichols WC, Soubrier F, Trembath RC, Loyd JE. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2019;**53**:1801899.

Moynahan ME, Pierce AJ, Jasin M. BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell* 2001;**7**:263–272.

Murugappan G, Li S, Alvero RJ, Luke B, Eisenberg ML. Association between infertility and all-cause mortality: analysis of US claims data. *Am J Obstet Gynecol* 2021;**225**:57.e1-57.e11.

Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, Krohn KJ, Lalioti MD, Mullis PE, Antonarakis SE, *et al.* Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 1997;**17**:393–398.

Nallathambi J, Moumné L, De Baere E, Beysen D, Usha K, Sundaresan P, Veitia RA. A novel polyalanine expansion in FOXL2: the first evidence for a recessive form of the blepharophimosis syndrome (BPES) associated with ovarian dysfunction. *Hum Genet* 2007;**121**:107–112.

Namnoum AB, Merriam GR, Moses AM, Levine MA. Reproductive dysfunction in women with Albright's hereditary osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;**83**:824–829.

Nappi RE, Chedraui P, Lambrinoudaki I, Simoncini T. Menopause: a cardiometabolic transition. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2022;**10**:442–456.

Neveling K, Endt D, Hoehn H, Schindler D. Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia. *Mutat Res* 2009;**668**:73–91.

Nilsson E, Larsen G, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C, Savenkova MI, Skinner MK. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of ovarian disease. *PLoS One* 2012;**7**:e36129.

Nishimura K, Ishiai M, Horikawa K, Fukagawa T, Takata M, Takisawa H, Kanemaki MT. Mcm8 and Mcm9 form a complex that functions in homologous recombination repair induced by DNA interstrand crosslinks. *Mol Cell* 2012;**47**:511–522.

Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boué J, Bertheas MF, Mandel JL. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991;**252**:1097–1102.

Oley C, Baraitser M. Blepharophimosis, ptosis, epicanthus inversus syndrome (BPES syndrome). *J Med Genet* 1988;**25**:47–51.

Oostra AB, Nieuwint AWM, Joenje H, Winter JP de. Diagnosis of fanconi anemia: chromosomal breakage analysis. *Anemia* 2012;**2012**:238731.

Ossewaarde ME, Bots ML, Verbeek ALM, Peeters PHM, Graaf Y van der, Grobbee DE, Schouw YT van der. Age at menopause, cause-specific mortality and total life expectancy. *Epidemiology* 2005;**16**:556–562.

Pagnamenta AT, Taanman J-W, Wilson CJ, Anderson NE, Marotta R, Duncan AJ, Bitner-Glindzicz M, Taylor RW, Laskowski A, Thorburn DR, *et al.* Dominant inheritance of premature ovarian failure associated with mutant mitochondrial DNA polymerase gamma. *Hum Reprod* 2006;**21**:2467–2473.

Palmero EI, Carraro DM, Alemar B, Moreira MAM, Ribeiro-Dos-Santos Â, Abe-Sandes K, Galvão HCR, Reis RM, Pádua Souza C de, Campacci N, *et al.* The germline mutational landscape of BRCA1 and BRCA2 in Brazil. *Sci Rep* 2018;**8**:9188.

Panay N, Anderson RA, Nappi RE, Vincent AJ, Vujovic S, Webber L, Wolfman W. Premature ovarian insufficiency: an International Menopause Society White Paper. *Climacteric* 2020;**23**:426–446.

Pasquino AM, Passeri F, Pucarelli I, Segni M, Municchi G. Spontaneous pubertal development in Turner's syndrome. Italian Study Group for Turner's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;**82**:1810–1813.

Patiño LC, Silgado D, Laissue P. A potential functional association between mutant BMPR2 and primary ovarian insufficiency. *Syst Biol Reprod Med* 2017;**63**:145–149.

Péanne R, Lonlay P de, Foulquier F, Kornak U, Lefeber DJ, Morava E, Pérez B, Seta N, Thiel C, Van Schaftingen E, *et al.* Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis? *Eur J Med Genet* 2018;**61**:643–663.

Persani L, Rossetti R, Di Pasquale E, Cacciatore C, Fabre S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum Reprod Update* 2014;**20**:869–883.

Pierce AJ, Johnson RD, Thompson LH, Jasin M. XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev* 1999;**13**:2633–2638.

Pierce SB, Chisholm KM, Lynch ED, Lee MK, Walsh T, Opitz JM, Li W, Klevit RE, King M-C. Mutations in mitochondrial histidyl tRNA synthetase HARS2 cause ovarian dysgenesis and sensorineural hearing loss of Perrault syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**:6543–6548.

Pierce SB, Gersak K, Michaelson-Cohen R, Walsh T, Lee MK, Malach D, Klevit RE, King M-C, Levy-Lahad E. Mutations in LARS2, encoding mitochondrial leucyl-tRNA synthetase, lead to premature ovarian failure and hearing loss in Perrault syndrome. *Am J Hum Genet* 2013;**92**:614–620.

Pierce SB, Walsh T, Chisholm KM, Lee MK, Thornton AM, Fiumara A, Opitz JM, Levy-Lahad E, Klevit RE, King M-C. Mutations in the DBP-deficiency protein HSD17B4 cause ovarian dysgenesis, hearing loss, and ataxia of Perrault Syndrome. *Am J Hum Genet* 2010;**87**:282–288.

Pinto P, Paulo P, Santos C, Rocha P, Pinto C, Veiga I, Pinheiro M, Peixoto A, Teixeira MR. Implementation of next-generation sequencing for molecular diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer highlights its genetic heterogeneity. *Breast Cancer Res Treat* 2016;**159**:245–256.

Polyzos NP, Neves AR, Drakopoulos P, Spits C, Alvaro Mercadal B, Garcia S, Ma PQM, Le LH, Ho MT, Mertens J, *et al.* The effect of polymorphisms in FSHR and FSHB genes on ovarian response: a prospective multicenter multinational study in Europe and Asia. *Hum Reprod* 2021;**36**:1711–1721.

Prakash R, Sandoval T, Morati F, Zagelbaum JA, Lim P-X, White T, Taylor B, Wang R, Desclos ECB, Sullivan MR, *et al.* Distinct pathways of homologous recombination controlled by the SWS1-SWSAP1-SPIDR complex. *Nat Commun* 2021;**12**:4255.

Qin Y, Choi Y, Zhao H, Simpson JL, Chen Z-J, Rajkovic A. NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 2007;**81**:576–581.

Qin Y, Guo T, Li G, Tang T-S, Zhao S, Jiao X, Gong J, Gao F, Guo C, Simpson JL, *et al.* CSB-PGBD3 Mutations Cause Premature Ovarian Failure. *PLoS Genet* 2015a;**11**:e1005419.

Qin Y, Jiao X, Simpson JL, Chen Z-J. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Hum Reprod Update* 2015b;**21**:787–808.

Qin Y, Zhang F, Chen Z-J. BRCA2 in Ovarian Development and Function. *N Engl J Med* 2019;**380**:1086.

Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 2004;**305**:1157–1159.

Rannikko A, Pakarinen P, Manna PR, Beau I, Misrahi M, Aittomäki K, Huhtaniemi I. Functional characterization of the human FSH receptor with an inactivating Ala189Val mutation. *Mol Hum Reprod* 2002;**8**:311–317.

Ray A, Shah A, Gudi A, Homburg R. Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reprod Biomed Online* 2012;**24**:591–602.

Rebbeck TR, Friebel TM, Friedman E, Hamann U, Huo D, Kwong A, Olah E, Olopade OI, Solano AR, Teo S-H, *et al.* Mutational spectrum in a worldwide study of 29,700 families with BRCA1 or BRCA2 mutations. *Hum Mutat* 2018;**39**:593–620.

Reddy P, Zheng W, Liu K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends Endocrinol Metab* 2010;**21**:96–103.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;**17**:405–424.

Richet C, Maza A, Dreyfus I, Bourrat E, Mazereeuw-Hautier J. Childhood pilomatricomas: Associated anomalies. *Pediatr Dermatol* 2018;**35**:548–551.

Riera-Escamilla A, Enguita-Marruedo A, Moreno-Mendoza D, Chianese C, Sleddens-Linkels E, Contini E, Benelli M, Natali A, Colpi GM, Ruiz-Castañé E, *et al.* Sequencing of a “mouse azoospermia” gene panel in azoospermic men: identification of RNF212 and STAG3 mutations as novel genetic causes of meiotic arrest. *Hum Reprod* 2019;**34**:978–988.

Rizzolio F, Pramparo T, Sala C, Zuffardi O, De Santis L, Rabellotti E, Calzi F, Fusi F, Bellazzi R, Toniolo D. Epigenetic analysis of the critical region I for premature ovarian failure: demonstration of a highly heterochromatic domain on the long arm of the mammalian X chromosome. *J Med Genet* 2009;**46**:585–592.

Roeters van Lennep JE, Heida KY, Bots ML, Hoek A, collaborators of the Dutch Multidisciplinary Guideline Development Group on Cardiovascular Risk Management after Reproductive Disorders. Cardiovascular disease risk in women with premature ovarian insufficiency: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol* 2016;**23**:178–186.

Rosario R, Stewart HL, Choudhury NR, Michlewski G, Charlet-Berguerand N, Anderson RA. Evidence for a fragile X messenger ribonucleoprotein 1 (FMR1) mRNA gain-of-function toxicity mechanism contributing to the pathogenesis of fragile X-associated premature ovarian insufficiency. *FASEB J* 2022;**36**:e22612.

Rossetti R, Ferrari I, Bestetti I, Moleri S, Brancati F, Petrone L, Finelli P, Persani L. Fundamental role of BMP15 in human ovarian folliculogenesis revealed by

null and missense mutations associated with primary ovarian insufficiency. *Hum Mutat* 2020;**41**:983–997.

Rossetti R, Ferrari I, Bonomi M, Persani L. Genetics of primary ovarian insufficiency. *Clin Genet* 2017;**91**:183–198.

Rouen A, Rogers E, Kerlan V, Delemer B, Catteau-Jonard S, Reznik Y, Gompel A, Cedrin I, Guedj A-M, Grouthier V, *et al.* Whole exome sequencing in a cohort of familial premature ovarian insufficiency cases reveals a broad array of pathogenic or likely pathogenic variants in 50% of families. *Fertil Steril* 2022;S0015-0282(21)02316-5.

Rubio-Gozalbo ME, Gubbels CS, Bakker JA, Menheere PPCA, Wodzig WKWH, Land JA. Gonadal function in male and female patients with classic galactosemia. *Hum Reprod Update* 2010;**16**:177–188.

Rubio-Gozalbo ME, Haskovic M, Bosch AM, Burnyte B, Coelho AI, Cassiman D, Couce ML, Dawson C, Demirbas D, Derks T, *et al.* The natural history of classic galactosemia: lessons from the GalNet registry. *Orphanet J Rare Dis* 2019;**14**:86.

Ruiz de Almodóvar JM, Steel GG, Whitaker SJ, McMillan TJ. A comparison of methods for calculating DNA double-strand break induction frequency in mammalian cells by pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol* 1994;**65**:641–649.

Ruth KS, Day FR, Hussain J, Martínez-Marchal A, Aiken CE, Azad A, Thompson DJ, Knoblochova L, Abe H, Tarry-Adkins JL, *et al.* Genetic insights into biological mechanisms governing human ovarian ageing. *Nature* 2021;**596**:393–397.

Ruth KS, Murray A. Lessons from Genome-Wide Association Studies in Reproductive Medicine: Menopause. *Semin Reprod Med* 2016;**34**:215–223.

Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, *et al.* A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995;**268**:1749–1753.

Sawyer SL, Tian L, Kähkönen M, Schwartzentruber J, Kircher M, University of Washington Centre for Mendelian Genomics, FORGE Canada Consortium, Majewski J, Dyment DA, Innes AM, *et al.* Biallelic mutations in BRCA1 cause a new Fanconi anemia subtype. *Cancer Discov* 2015;**5**:135–142.

Schubert S, Ripperger T, Rood M, Petkidis A, Hofmann W, Frye-Boukhriss H, Tauscher M, Auber B, Hille-Betz U, Illig T, *et al.* GT198 (PSMC3IP) germline variants in early-onset breast cancer patients from hereditary breast and ovarian cancer families. *Genes Cancer* 2017;**8**:472–483.

Senapati S. Infertility: a marker of future health risk in women? *Fertil Steril* 2018;**110**:783–789.

Seo A, Steinberg-Shemer O, Unal S, Casadei S, Walsh T, Gumruk F, Shalev S, Shimamura A, Akarsu NA, Tamary H, *et al.* Mechanism for survival of homozygous nonsense mutations in the tumor suppressor gene BRCA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;**115**:5241–5246.

Shah SP, Köbel M, Senz J, Morin RD, Clarke BA, Wiegand KC, Leung G, Zayed A, Mehl E, Kalloger SE, *et al.* Mutation of FOXL2 in granulosa-cell tumors of the ovary. *N Engl J Med* 2009;**360**:2719–2729.

Sharan SK, Morimatsu M, Albrecht U, Lim DS, Regel E, Dinh C, Sands A, Eichele G, Hasty P, Bradley A. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* 1997;**386**:804–810.

Shimelis H, Mesman RLS, Von Nicolai C, Ehlen A, Guidugli L, Martin C, Calléja FMGR, Meeks H, Hallberg E, Hinton J, *et al.* BRCA2 Hypomorphic Missense Variants Confer Moderate Risks of Breast Cancer. *Cancer Res* 2017;**77**:2789–2799.

Shin J, Han K, Jung JH, Park HJ, Kim W, Huh Y, Kim YH, Kim DH, Kim SM, Choi YS, *et al.* Age at menopause and risk of heart failure and atrial fibrillation: a nationwide cohort study. *Eur Heart J* 2022;ehac364.

Shukla V, Høffding MK, Hoffmann ER. Genome diversity and instability in human germ cells and preimplantation embryos. *Semin Cell Dev Biol* 2021;

Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* 2022;**72**:7–33.

Silva CA, Yamakami LYS, Aikawa NE, Araujo DB, Carvalho JF, Bonfá E. Autoimmune primary ovarian insufficiency. *Autoimmun Rev* 2014;**13**:427–430.

Smirin-Yosef P, Zuckerman-Levin N, Tzur S, Granot Y, Cohen L, Sachsenweger J, Borck G, Lagovsky I, Salmon-Divon M, Wiesmüller L, *et al.* A Biallelic Mutation in the Homologous Recombination Repair Gene SPIDR Is Associated With Human Gonadal Dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;**102**:681–688.

Snieder H, MacGregor AJ, Spector TD. Genes control the cessation of a woman's reproductive life: a twin study of hysterectomy and age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;**83**:1875–1880.

Snowdon DA, Kane RL, Beeson WL, Burke GL, Sprafka JM, Potter J, Iso H, Jacobs DR, Phillips RL. Is early natural menopause a biologic marker of health and aging? *Am J Public Health* 1989;**79**:709–714.

Solomon DA, Kim T, Diaz-Martinez LA, Fair J, Elkahloun AG, Harris BT, Toretsky JA, Rosenberg SA, Shukla N, Ladanyi M, *et al.* Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. *Science* 2011;**333**:1039–1043.

Sonigo C. Onco-fertilité : Impact des facteurs influençant la réserve ovarienne après chimiothérapie. 2018; Université Paris-Saclay (ComUE)Available from: https://www.theses.fr/2018SACLS184.

Sonigo C, Grynberg M, Bringer S, Sermondade N. [Oncofertility and breast cancer]. *Bull Cancer* 2019;**106**:S43–S52.

Spears N, Lopes F, Stefansdottir A, Rossi V, De Felici M, Anderson RA, Klinger FG. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. *Hum Reprod Update* 2019;**25**:673–693.

Stentz NC, Koelper N, Barnhart KT, Sammel MD, Senapati S. Infertility and mortality. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2020;**222**:251.e1-251.e10.

Stevenson JC, Collins P, Hamoda H, Lambrinoudaki I, Maas AHEM, Maclaran K, Panay N. Cardiometabolic health in premature ovarian insufficiency. *Climacteric* 2021;**24**:474–480.

Stolk L, Perry JRB, Chasman DI, He C, Mangino M, Sulem P, Barbalic M, Broer L, Byrne EM, Ernst F, *et al.* Meta-analyses identify 13 loci associated with age

at menopause and highlight DNA repair and immune pathways. *Nat Genet* 2012;**44**:260–268.

Stolk L, Zhai G, Meurs JBJ van, Verbiest MMPJ, Visser JA, Estrada K, Rivadeneira F, Williams FM, Cherkas L, Deloukas P, *et al.* Loci at chromosomes 13, 19 and 20 influence age at natural menopause. *Nat Genet* 2009;**41**:645–647.

Stringer JM, Winship A, Liew SH, Hutt K. The capacity of oocytes for DNA repair. *Cell Mol Life Sci* 2018;**75**:2777–2792.

Stringer JM, Winship A, Zerafa N, Wakefield M, Hutt K. Oocytes can efficiently repair DNA double-strand breaks to restore genetic integrity and protect offspring health. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020;**117**:11513–11522.

Swerdlow AJ, Cooke R, Beckers D, Borgström B, Butler G, Carel J-C, Cianfarani S, Clayton P, Coste J, Deodati A, *et al.* Cancer Risks in Patients Treated With Growth Hormone in Childhood: The SAGhE European Cohort Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;**102**:1661–1672.

Sybert VP, McCauley E. Turner's syndrome. *N Engl J Med* 2004;**351**:1227–1238.

Tariq S, Anderson J, Burns F, Delpech V, Gilson R, Sabin C. The menopause transition in women living with HIV: current evidence and future avenues of research. *J Virus Erad* 2016;**2**:114–116.

Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Gane LW, Godfrey TE, Hagerman PJ. Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet* 2000;**66**:6–15.

Taylor AMR, Rothblum-Oviatt C, Ellis NA, Hickson ID, Meyer S, Crawford TO, Smogorzewska A, Pietrucha B, Weemaes C, Stewart GS. Chromosome instability syndromes. *Nat Rev Dis Primers* 2019;**5**:64.

Tenenbaum-Rakover Y, Weinberg-Shukron A, Renbaum P, Lobel O, Eideh H, Gulsuner S, Dahary D, Abu-Rayyan A, Kanaan M, Levy-Lahad E, *et al.* Minichromosome maintenance complex component 8 (MCM8) gene mutations result in primary gonadal failure. *J Med Genet* 2015;**52**:391–399.

Touraine P, Beau I, Gougeon A, Meduri G, Desroches A, Pichard C, Detoeuf M, Paniel B, Prieur M, Zorn JR, *et al.* New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. *Mol Endocrinol* 1999;**13**:1844–1854.

Traver S, Coulombe P, Peiffer I, Hutchins JRA, Kitzmann M, Latreille D, Méchali M. MCM9 Is Required for Mammalian DNA Mismatch Repair. *Mol Cell* 2015;**59**:831–839.

Tsui V, Crismani W. The Fanconi Anemia Pathway and Fertility. *Trends Genet* 2019;**35**:199–214.

Tsuzuki T, Fujii Y, Sakumi K, Tominaga Y, Nakao K, Sekiguchi M, Matsushiro A, Yoshimura Y, MoritaT null. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:6236–6240.

Tucker EJ. The Genetics and Biology of FOXL2. *Sex Dev* 2021;1–10.

Tucker EJ, Bell KM, Robevska G, Bergen J van den, Ayers KL, Listyasari N, Faradz SM, Dulon J, Bakhshalizadeh S, Sreenivasan R, *et al.* Meiotic genes in premature ovarian insufficiency: variants in HROB and REC8 as likely genetic causes. *Eur J Hum Genet* 2022a;**30**:219–228.

Tucker EJ, Tan TY, Stark Z, Sinclair AH. Genomic testing in premature ovarian insufficiency: proceed with caution. *Biol Reprod* 2022b;ioac153.

Turchetti D, Zuntini R, Tricarico R. BRCA2 in Ovarian Development and Function. *N Engl J Med* 2019;**380**:1086–1087.

Vabre P, Gatimel N, Moreau J, Gayrard V, Picard-Hagen N, Parinaud J, Leandri RD. Environmental pollutants, a possible etiology for premature ovarian insufficiency: a narrative review of animal and human data. *Environ Health* 2017;**16**:37.

Vander Borght M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem* 2018;**62**:2–10.

Vassard D, Schmidt L, Pinborg A, Petersen GL, Forman JL, Hageman I, Glazer CH, Kamper-Jørgensen M. Mortality in Women Treated With Assisted Reproductive Technology-Addressing the Healthy Patient Effect. *Am J Epidemiol* 2018;**187**:1889–1895.

Veitia RA. Primary ovarian insufficiency, meiosis and DNA repair. *Biomed J* 2020;**43**:115–123.

Velde ER te, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update* 2002;**8**:141–154.

Verdin H, Matton C, De Baere E. Blepharophimosis, Ptosis, and Epicanthus Inversus Syndrome. In Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews*® [Internet] 1993; University of Washington, Seattle: Seattle (WA)Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1441/.

Verrilli L, Johnstone E, Welt C, Allen-Brady K. Primary ovarian insufficiency has strong familiality: results of a multigenerational genealogical study. *Fertil Steril* 2022;S0015-0282(22)01444-3.

Vries L de, Behar DM, Smirin-Yosef P, Lagovsky I, Tzur S, Basel-Vanagaite L. Exome sequencing reveals SYCE1 mutation associated with autosomal recessive primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;**99**:E2129-2132.

Vuillaumier-Barrot S, Isidor B, Dupré T, Le Bizec C, David A, Seta N. Expanding the Spectrum of PMM2-CDG Phenotype. *JIMD Rep* 2012;**5**:123–125.

WAARDENBURG PJ. *Genetics and Ophthalmology. By P.J. Waardenburg ... A. Franceschetti ... D. Klein*. 1961; Assen.

Walsh T, Casadei S, Lee MK, Pennil CC, Nord AS, Thornton AM, Roeb W, Agnew KJ, Stray SM, Wickramanayake A, *et al.* Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;**108**:18032–18037.

Wan L, Han J, Liu T, Dong S, Xie F, Chen H, Huang J. Scaffolding protein SPIDR/KIAA0146 connects the Bloom syndrome helicase with homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;**110**:10646–10651.

Wang AT, Kim T, Wagner JE, Conti BA, Lach FP, Huang AL, Molina H, Sanborn EM, Zierhut H, Cornes BK, *et al.* A Dominant Mutation in Human RAD51 Reveals Its Function in DNA Interstrand Crosslink Repair Independent of Homologous Recombination. *Mol Cell* 2015a;**59**:478–490.

Wang F, Guo S, Li P. Two novel mutations in the MCM8 gene shared by two Chinese siblings with primary ovarian insufficiency and short stature. *Mol Genet Genomic Med* 2020;**8**:e1396.

Wang H, Li G, Zhang J, Gao F, Li W, Qin Y, Chen Z-J. Novel WT1 Missense Mutations in Han Chinese Women with Premature Ovarian Failure. *Sci Rep* 2015b;**5**:13983.

Wang J, Zhang W, Jiang H, Wu B-L, Primary Ovarian Insufficiency Collaboration. Mutations in HFM1 in recessive primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med* 2014;**370**:972–974.

Wang Y, Bernhardy AJ, Cruz C, Krais JJ, Nacson J, Nicolas E, Peri S, Gulden H van der, Heijden I van der, O'Brien SW, *et al.* The BRCA1-Δ11q Alternative Splice Isoform Bypasses Germline Mutations and Promotes Therapeutic Resistance to PARP Inhibition and Cisplatin. *Cancer Res* 2016;**76**:2778–2790.

Wang Y-X, Farland LV, Wang S, Gaskins AJ, Wang L, Rich-Edwards JW, Tamimi R, Missmer SA, Chavarro JE. Association of infertility with premature mortality among US women: Prospective cohort study. *Lancet Reg Health Am* 2022;**7**:100122.

Weinberg-Shukron A, Rachmiel M, Renbaum P, Gulsuner S, Walsh T, Lobel O, Dreifuss A, Ben-Moshe A, Zeligson S, Segel R, *et al.* Essential Role of BRCA2 in Ovarian Development and Function. *N Engl J Med* 2018;**379**:1042–1049.

Wen WX, Allen J, Lai KN, Mariapun S, Hasan SN, Ng PS, Lee DS-C, Lee SY, Yoon S-Y, Lim J, *et al.* Inherited mutations in BRCA1 and BRCA2 in an unselected multiethnic cohort of Asian patients with breast cancer and healthy controls from Malaysia. *J Med Genet* 2018;**55**:97–103.

Weng Z, Li J, Zheng J, Li H, Zuer L, Zhou Y, Dongyi X, Liang H, Liu Y. Molecular insights into the MCM8/9 helicase complex in DNA unwinding and translocation. 2022;2022.01.26.477944. bioRxivAvailable from: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.01.26.477944v1.

Winship AL, Stringer JM, Liew SH, Hutt KJ. The importance of DNA repair for maintaining oocyte quality in response to anti-cancer treatments, environmental toxins and maternal ageing. *Hum Reprod Update* 2018;**24**:119–134.

Wood-Trageser MA, Gurbuz F, Yatsenko SA, Jeffries EP, Kotan LD, Surti U, Ketterer DM, Matic J, Chipkin J, Jiang H, *et al.* MCM9 mutations are associated with ovarian failure, short stature, and chromosomal instability. *Am J Hum Genet* 2014;**95**:754–762.

Wu W, Liu Y, Zhou Q, Wang Q, Luo F, Xu Z, Geng Q, Li P, Zhang HZ, Xie J. Novel homozygous FANCL mutation and somatic heterozygous SETBP1 mutation in a Chinese girl with Fanconi Anemia. *Eur J Med Genet* 2017;**60**:369–373.

Wu Z, Liu K, Zhang C. Clinical applications of in vitro primordial follicle activation. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research* 2021;**18**:194–200.

Xiao W-J, He W-B, Zhang Y-X, Meng L-L, Lu G-X, Lin G, Tan Y-Q, Du J. In-Frame Variants in STAG3 Gene Cause Premature Ovarian Insufficiency. *Front Genet* 2019;**10**:1016.

Xu X, Jones M, Mishra GD. Age at natural menopause and development of chronic conditions and multimorbidity: results from an Australian prospective cohort. *Hum Reprod* 2020;**35**:203–211.

Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH, Zheng N, Chen P-L, Lee W-H, Pavletich NP. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* 2002;**297**:1837–1848.

Yang HJ, Suh PS, Kim SJ, Lee SY. Effects of Smoking on Menopausal Age: Results From the Korea National Health and Nutrition Examination Survey, 2007 to 2012. *J Prev Med Public Health* 2015;**48**:216–224.

Yang X, Touraine P, Desai S, Humphreys G, Jiang H, Yatsenko A, Rajkovic A. Gene variants identified by whole-exome sequencing in 33 French women with premature ovarian insufficiency. *J Assist Reprod Genet* 2019a;**36**:39–45.

Yang X, Zhang X, Jiao J, Zhang F, Pan Y, Wang Q, Chen Q, Cai B, Tang S, Zhou Z, *et al.* Rare variants in FANCA induce premature ovarian insufficiency. *Hum Genet* 2019b;**138**:1227–1236.

Yang Y, Guo T, Liu R, Ke H, Xu W, Zhao S, Qin Y. FANCL gene mutations in premature ovarian insufficiency. *Hum Mutat* 2020;**41**:1033–1041.

Yin H, Ma H, Hussain S, Zhang H, Xie X, Jiang L, Jiang X, Iqbal F, Bukhari I, Jiang H, *et al.* A homozygous FANCM frameshift pathogenic variant causes male infertility. *Genet Med* 2019;**21**:62–70.

Yoo JE, Shin DW, Han K, Kim D, Yoon JW, Lee D-Y. Association of Female Reproductive Factors With Incidence of Fracture Among Postmenopausal Women in Korea. *JAMA Netw Open* 2021;**4**:e2030405.

Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, Matthews S, Nakura J, Miki T, Ouais S, *et al.* Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 1996;**272**:258–262.

Yuan J, Chen J. FIGNL1-containing protein complex is required for efficient homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;**110**:10640–10645.

Zangen D, Kaufman Y, Zeligson S, Perlberg S, Fridman H, Kanaan M, Abdulhadi-Atwan M, Abu Libdeh A, Gussow A, Kisslov I, *et al.* XX ovarian dysgenesis is caused by a PSMC3IP/HOP2 mutation that abolishes coactivation of estrogen-driven transcription. *Am J Hum Genet* 2011;**89**:572–579.

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, Mouzon J de, Sokol R, Rienzi L, Sunde A, Schmidt L, Cooke ID, *et al.* The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Hum Reprod* 2017;**32**:1786–1801.

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Mouzon J de, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009∗. *Fertility and Sterility* 2009;**92**:1520–1524.

Zhang D, Liu Y, Zhang Z, Lv P, Liu Y, Li J, Wu Y, Zhang R, Huang Y, Xu G, *et al.* Basonuclin 1 deficiency is a cause of primary ovarian insufficiency. *Hum Mol Genet* 2018a;**27**:3787–3800.

Zhang J, Fujiwara Y, Yamamoto S, Shibuya H. A meiosis-specific BRCA2 binding protein recruits recombinases to DNA double-strand breaks to ensure homologous recombination. *Nat Commun* 2019a;**10**:722.

Zhang Y, Xu X, Hu M, Wang X, Cheng H, Zhou R. SPATA33 is an autophagy mediator for cargo selectivity in germline mitophagy. *Cell Death Differ* 2021;**28**:1076–1090.

Zhang Y, Yan Z, Qin Q, Nisenblat V, Chang H-M, Yu Y, Wang T, Lu C, Yang M, Yang S, *et al.* Transcriptome Landscape of Human Folliculogenesis Reveals Oocyte and Granulosa Cell Interactions. *Mol Cell* 2018b;**72**:1021-1034.e4.

Zhang Y-X, He W-B, Xiao W-J, Meng L-L, Tan C, Du J, Lu G-X, Lin G, Tan Y-Q. Novel loss-of-function mutation in MCM8 causes premature ovarian insufficiency. *Mol Genet Genomic Med* 2020;**8**:e1165.

Zhang Y-X, Li H-Y, He W-B, Tu C, Du J, Li W, Lu G-X, Lin G, Yang Y, Tan Y-Q. XRCC2 mutation causes premature ovarian insufficiency as well as non-obstructive azoospermia in humans. *Clin Genet* 2019b;**95**:442–443.

Zhao H, Chen Z-J, Qin Y, Shi Y, Wang S, Choi Y, Simpson JL, Rajkovic A. Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 2008;**82**:1342–1348.

Zhou Y, Qin Y, Qin Y, Xu B, Guo T, Ke H, Chen M, Zhang L, Han F, Li Y, *et al.* Wdr62 is involved in meiotic initiation via activating JNK signaling and associated with POI in humans. *PLoS Genet* 2018a;**14**:e1007463.

Zhou Y, Qin Y, Qin Y, Xu B, Guo T, Ke H, Chen M, Zhang L, Han F, Li Y, *et al.* Wdr62 is involved in female meiotic initiation via activating JNK signaling and associated with POI in humans. *PLoS Genet* 2018b;**14**:e1007463.

Zhu D, Chung H-F, Dobson AJ, Pandeya N, Giles GG, Bruinsma F, Brunner EJ, Kuh D, Hardy R, Avis NE, *et al.* Age at natural menopause and risk of incident cardiovascular disease: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Public Health* 2019;**4**:e553–e564.

Zlotogora J, Sagi M, Cohen T. The blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome: delineation of two types. *Am J Hum Genet* 1983;**35**:1020–1027.

7 ANNEXES

Revue générale :

7.1 ADVANCES IN THE MOLECULAR PATHOPHYSIOLOGY, GENETICS, AND TREATMENT OF PRIMARY OVARIAN INSUFFICIENCY

Ilpo Huhtaniemi , Outi Hovatta , Antonio La Marca , Gabriel Livera , Danielle Monniaux , Luca Persani , **Abdelkader Heddar**, Katarzyna Jarzabek , Triin Laisk-Podar , Andres Salumets , Juha S Tapanainen , Reiner A Veitia , Jenny A Visser , Peter Wieacker , Slawomir Wolczynski, Micheline Misrahi

Trends Endocrinol Metab. 2018 Jun;29(6):400-419. doi: 0.1016/j.tem.2018.03.010.

Trends in Endocrinology & Metabolism

CellPress
REVIEWS

Review

Advances in the Molecular Pathophysiology, Genetics, and Treatment of Primary Ovarian Insufficiency

Ilpo Huhtaniemi,[1] Outi Hovatta,[2] Antonio La Marca,[3] Gabriel Livera,[4] Danielle Monniaux,[5] Luca Persani,[6,*] Abdelkader Heddar,[7] Katarzyna Jarzabek,[8] Triin Laisk-Podar,[9,10] Andres Salumets,[9,10] Juha S. Tapanainen,[11,12] Reiner A. Veitia,[13] Jenny A. Visser,[14] Peter Wieacker,[15] Slawomir Wolczynski,[16] and Micheline Misrahi[7,*]

Primary ovarian insufficiency (POI) affects ~1% of women before 40 years of age. The recent leap in genetic knowledge obtained by next generation sequencing (NGS) together with animal models has further elucidated its molecular pathogenesis, identifying novel genes/pathways. Mutations of >60 genes emphasize high genetic heterogeneity. Genome-wide association studies have revealed a shared genetic background between POI and reproductive aging. NGS will provide a genetic diagnosis leading to genetic/therapeutic counseling: first, defects in meiosis or DNA repair genes may predispose to tumors; and second, specific gene defects may predict the risk of rapid loss of a persistent ovarian reserve, an important determinant in fertility preservation. Indeed, a recent innovative treatment of POI by *in vitro* activation of dormant follicles proved to be successful.

Highlights

The mechanisms underlying the formation of the ovarian reserve are generally well conserved, from *Drosophila* to mammals. Owing to this high degree of conservation, factors shown to regulate the ovarian reserve in mouse models are all potential candidates for identifying mutations associated with POI in humans.

With the generation of genetically modified mice, much insight has been gained into the mechanisms that control the formation of the ovarian reserve and trigger the activation of primordial follicles.

Comparison with animal models is complicated by the fact that the phenotype of complete gene deletion in knockout models may not be mimicked by single gene mutations.

Recently innovative treatment for POI based on *in vitro* activation of the dormant primordial follicular pool has been developed.

Introduction

Primary ovarian insufficiency (POI), affects ~1% of women before 40 years of age, thus being a relatively frequent syndrome [1]. POI is often diagnosed too late, causing irreversible impairment to the fertility and well-being of the affected women. Recent data indicate that POI is associated with significant morbidity and mortality. Several of these risks are direct consequences of extra-ovarian defects, generated by the gene mutations that underlie some forms of POI [2]. The clinical relevance of POI has exponentially increased only very recently, particularly in economically advanced countries, due to the frequent choice of women to conceive after 30 years of age and the increased life expectancy.

POI can manifest as pubertal delay and primary amenorrhea (PA), secondary amenorrhea (SA), or oligomenorrhea of ≥4 months. Recurrence of menses and pregnancies can occur in up to 22% of cases with SA for up to 4 months [3], but spontaneous resumption of follicle activity is exceptional in cases with long-lasting SA. The POI-associated hypergonadotropic hypogonadisms is defined as elevation of **follicle-stimulating hormone (FSH)** (see Glossary) ≥ 25 IU/L confirmed twice, 30 days apart, in women with SA [1]. The **ovarian reserve (OR)** can be evaluated by transvaginal ovarian ultrasound (US) with antral follicular count and/or by **anti-Müllerian hormone (AMH)** determination. In both PA and SA cases, it is possible to uncover a certain OR by US and AMH measurement [4].

[1]Institute of Reproductive and Developmental Biology, Department of Surgery & Cancer, Imperial College London, Hammersmith Campus, London W12 0NN, UK
[2]Karolinska Institute, Stockholm, Sweden, Nova Southeastern University, Fort Lauderdale, FL, USA
[3]Mother-Infant Department, University of Modena and Reggio Emilia, Modena 41100, Italy
[4]Laboratory of Development of the

Crown Copyright © 2018 Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Low/undetectable AMH indicates a dramatic diminution of the OR, predicting poor success of fertility preservation. However, follicular activity and pregnancy were rescued in POI patients with undetectable serum AMH after ***in vitro* activation (IVA)** and autotransplantation of fresh tissue [5].

Menstrual irregularities, such as oligoamenorrhea or polymenorrhea, can anticipate the onset of SA, but not as a rule.

Many clinicians are unaware of the advantages of early POI diagnosis and fail to provide integrated personal care to address all the clinical needs. Here, we review the pathophysiology, genetics and treatment of POI in order to shed light on: (i) the manifestations that should alert clinicians, and (ii) the novel multidisciplinary approaches for improved clinical management.

Iatrogenic POI frequently occurs in cancer survivors of young age. A variety of environmental factors, such as infections or pollutants like phthalates, bisphenol A, and polycyclic aromatic hydrocarbons from cigarette smoke, have a harmful impact on reproduction and are implicated in about 10% of POI [6]. Pollutants can affect ovarian follicles mainly by binding to estrogen or aryl hydrocarbon receptors, severely affecting follicle growth and viability [7]. Moreover, pollutants can cause germline epigenetic modifications, thereby accounting for transgenerational inheritance of reduced OR [8]. About 5%–30% of POI may have autoimmune origin [9], which is of potential interest because an early diagnosis may allow prompt treatment and eventually prevent damage to the OR.

The incidence of familial cases of premature ovarian failure was reported to vary from 4% to 31% [10,11]. Thorough evaluation of alleged affected relatives showed a lower incidence (12.7%) than the original family history suggested [12]. Pedigree studies on affected families showed a mode of inheritance suggestive of autosomal dominant or recessive transmission with highly variable expressivity or X-linked inheritance with incomplete penetrance [13]. Approximately 2–6% of women with sporadic POI have a premutation of the *FMR1* gene [14]. Other known genetic causes are responsible for a small proportion of POIs.

Most causes of POI are unknown. Understanding the underlying molecular mechanisms is essential to develop strategies for prevention, early diagnosis, and improved management of POI.

A great leap in the genetics of POI was achieved by the major methodological progress of **next generation sequencing (NGS)** and in particular **whole exome sequencing (WES)**. The knowledge of more than 60 genes has enabled genetic diagnosis by NGS and provided a flow chart for the diagnosis and treatment of POI (see below). A novel innovative treatment of the infertility of these patients has recently emerged.

Establishment of the OR

Primordial follicles (PFs) constitute the entire OR. Mechanisms that regulate the formation of the PF pool and the rate by which it is used will determine the duration of the fertile lifespan (Figures 1 and 2). OR formation is a similar process in humans and mice, and in recent years, much insight has been gained into the molecular mechanisms involved.

At 20 weeks of gestation, a pair of human ovaries contains close to 7 million germ cells [15]. A rapid loss of follicles in fetal life results in about 1–2 million oocytes at birth. Prior to puberty, the number declines further, to 300 000–400 000. During reproductive life, the number declines

Gonads, Unit of Genetic Stability, Stem Cells and Radiation: UMR 967, INSERM; CEA/DRF/IRCM/SCSR; Univ. Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité; Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Fontenay aux Roses, F-92265, France
[5]UMR85 PRC, Physiology of Reproduction and Behavior, INRA, CNRS, IFCE, University of Tours, 37380 Nouzilly, France
[6]Department of Clinical Sciences & Community Health, University of Milan, Milan 20122, Division of Endocrine and Metabolic Diseases, Istituto Auxologico Italiano, Milan 20149, Italy
[7]Medical Faculty, Univ. Paris Sud and Paris Saclay, Bicetre Hospital 94275, Le Kremlin Bicêtre, France
[8]Department of Biology and Pathology of Human Reproduction, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, 10-748 Olsztyn, Poland
[9]Women's Clinic, Institute of Clinical Medicine, University of Tartu, L. Puusepa 8, Tartu, Estonia
[10]Competence Centre on Health Technologies, 50410, Estonia
[11]Department of Obstetrics and Gynecology, University of Helsinki and Helsinki University, Hospital, Helsinki 00029, Finland
[12]Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital of Oulu, University of Oulu, Medical Research Center Oulu and PEDEGO Research Unit, P.O BOX 23, FI-90029 OYS, Oulu, Finland
[13]Molecular Oncology and Ovarian Pathologies Université Paris-Diderot/Paris 7, Institut Jacques Monod, 15 Rue Hélène Brion, Paris Cedex 13, France
[14]Dept. of Internal Medicine, Erasmus University Medical Center, P.O. Box 2040, 3000 CA, Rotterdam, The Netherlands
[15]Institute of Human Genetics, University Hospital of Münster, Vesaliusweg 12-14 D48149 Münster, Germany
[16]Department of Reproduction and Gynecological Endocrinology, Medical University of Bialystok, Sklodowskiej 24A, 15-276 Bialystok, Poland

*Correspondence:
micheline.misrahi@aphp.fr, luca.persani@unimi.it (M. Misrahi).

steadily until a critical threshold of 1000 PFs is reached [15]. Below this threshold, ovulations cannot be supported, yielding menopause.

Oocytes derive from **primordial germ cells (PGCs)**, which emerge from the extraembryonic mesoderm and migrate to the genital ridge (Figure 1). Upon arrival in the gonad, the PGCs will yield interconnected oogonia which, together with aggregation of germ cells, create so-called germ cell cysts [16]. Somatic cell-derived factors, in particular bone morphogenetic proteins (BMPs) and Wnt3/β-catenin, control the commitment, migration, and proliferation of PGCs. These signaling pathways induce the reacquisition of pluripotency, which is driven by Prdm1 and Prdm14. Subsequently, pluripotency genes (*Pou5F1* encoding Oct4, *Nanog*, *Klf4*, *Lin 28a*) and germline specific genes (early genes: *Nanos3*, *Kitlg*, *Tfapc2*, *Dppa3*; late genes: *Ddx4* or *Vasa*, *Mael*, *Dazl*) play important roles in the migration, proliferation, and survival of PGCs [16]. After cessation of mitosis, the oogonia enter **meiosis** (13.5 days postconception in mouse and asynchronously ~10–12 weeks of gestation in humans) and become oocytes (Figures 1 and 2). They will progress through the initial stages of prophase I until arrest in the diplotene stage of prophase I. The initiation of meiosis is dependent on expression of *Dazl*, which induces responsiveness to retinoic acid, which in turn induces Stra8 (stimulated by retinoic acid)-dependent and -independent pathways, and subsequently the activation of the synaptonemal complex (SC) proteins Sycp1, 2, and 3. Recently, Taf4b was identified as an upstream regulator of several meiotic genes, including *Stra8* and *Dazl*, in both mice and women [17]. Additionally it recently appeared that post-transcriptional mechanisms involving the Ythdc2/Meioc complex are mandatory for the proper mitotic/meiotic transition [18,19].

The next developmental step in follicle formation is the breakdown of germ cell cysts between E17.5 and 5 days postpartum in mice and at midgestation (10–13 weeks of gestation) in humans (Figure 1). Upon breakdown, pregranulosa cells are recruited to encapsulate a single oocyte to form PF, and oocytes undergo meiotic arrest. Gdf9, Bmp15, FoxL2, Nobox, Figla, Notch2, and Adam10 include some of the factors that affect the timing of cyst breakdown and differentiation of pregranulosa cells [20,21]. Furthermore, estrogen signaling plays an inhibitory role in cyst breakdown [22]. At the cessation of mitosis, the number of oogonia has increased exponentially. However, it is estimated that during cyst breakdown, two-thirds of the oocytes are lost through programmed cell death, including apoptosis and autophagy [23].

Genetic modification in mice has been beneficial for identification of the crucial genes in establishment of the OR. Mutations in several of these genes have been identified in women with POI.

Recent Advances in the Genetics of POI in Humans

The genetic causes of POI are highly heterogeneous, with isolated or syndromic forms. Reproductive and extra-reproductive features of syndromic POI are described in Table 1. The genes involved are listed in Figures 1–3 and Table 1.

Meiosis, DNA Repair, and POI

Mutations of meiotic and DNA repair genes are responsible for syndromic and nonsyndromic POI (Figures 2 and 3). There have been recent major advances in the identification of these genes as a cause of POI through NGS studies.

Oocytes enter into and progress through meiosis prophase I during fetal life. Mutations in meiotic genes usually impair meiotic progression and trigger oocyte death, as evidenced by several mouse models [24].

Glossary

Anti-Müllerian hormone (AMH): a growth factor produced by the granulosa cells of growing follicles. Serum AMH level is an indirect marker of the ovarian reserve and declines with increasing age.
Follicle-stimulating hormone (FSH): a pituitary-derived hormone that stimulates estrogen production, follicle growth, and selection of the preovulatory follicle. Serum FSH levels are elevated upon ovarian aging due to the loss of negative feedback signals. Normal FSH concentrations (IU/l) are: during follicular phase, 3.5–9.0; ovulatory phase, 7.0–21.5; luteal phase, 1.7–7.0; postmenopause, 26–140.
Homologous recombination (HR): a process that assures faithful repair of double strand breaks, one of the most dangerous DNA damages. HR relies on the invasion of a similar DNA matrix (the homologous chromosome during meiosis) as a template to repair the broken DNA. The products of this repair can either be a local replacement of DNA sequence or exchange of large chromosome fragments, respectively termed non-crossover and crossover. The meiotic crossovers are mandatory for proper segregation of chromosomes, thus precisely halving the genome in gametes.
***In vitro* activation (IVA):** although menstrual cycles cease in POI patients, some of them retain residual dormant ovarian follicles. A new infertility treatment has been developed, which enables POI patients to conceive using their own eggs, by activation of the residual dormant follicles through *in vitro* manipulation of signaling pathways responsible for follicular quiescence.
Luteinizing hormone (LH): a pituitary-derived hormone that triggers ovulation. Serum LH levels increase upon ovarian aging due to the loss of negative feedback signals.
Meiosis: meiosis is the universal cellular process in eukaryotes that allows formation of the haploid reproductive cells.
DNA double strand breaks (DSBs): DSBs are programmed DNA breaks generated early during prophase I and catalyzed by the sporulation 11 homolog (SPO11) enzyme. DSBs are concentrated in

During prophase I, meiosis requires the establishment of the SC and the generation and repair of **DNA double strand breaks (DSBs)** [25]. Cohesin rings surrounding the chromosomes contribute to proper formation of the SC. Stromal antigen 3 (*STAG3*), Recombination 8 (*REC8*), Structural Maintenance of Chromosomes 1B (*SMC1B*), and Radiation Sensitive 21-Like (*RAD21L*) encode proteins belonging to the cohesin family and are specific to meiosis. Exome sequencing revealed that the two copies of *STAG3* are inactivated by a truncating mutation in patients with POI from a consanguineous family [26]. Of note, one patient had bilateral ovarian tumors. Inactivation of *Stag3* in mice impairs meiotic progression and leads to oocyte death [27]. *SMC1B* and *REC8* have also been proposed to be associated with POI [28]. The SC is formed by several proteins organized in lateral and central elements [25]. A homozygous mutation of the Synaptonemal Complex Central Element Protein 1 (*SYCE1*) was described in two sisters with POI in a consanguineous family [29], consistent with infertility observed in animal models [30].

Mini Chromosome Maintenance 8 and 9 are helicase members of the MCM family. MCM8-9 complex is required for **homologous recombination (HR)**-mediated repair of DSB, facilitating DNA resection by the MRN complex [31]. Lack of *Mcm8* or *Mcm9* in mice induces meiotic defects, oocyte degeneration, and ovarian tumors. Regarding *MCM8*, the analysis of three consanguineous sisters with hypothyroidism and POI revealed the presence of a pathogenic variant [32]. The study of several other consanguineous families allowed the identification of homozygous variants for MCM8 and MCM9 in the affected patients [33–36].

For MCM8 and MCM9, the repair of chromosomal breaks in fibroblasts or lymphocytes of the patients was found to be altered [32,33].

Meiotic DSB repair requires the loading of two recombinases, RAD51 and its meiotic paralog DMC1, on DNA. The activities of DMC1 and RAD51 are regulated by many factors, including homologous-pairing protein 2 homolog (HOP2/PSMC3IP). Only one homozygous mutation in *DMC1* has been reported in women with POI [37]. The study of a Palestinian family using homozygosity mapping and NGS allowed the detection of a homozygous microdeletion in the *PSMC3IP* gene [38]. The possibility of a meiotic defect in the patients studied was not examined directly.

The recombination intermediates need to be stabilized to promote the formation of crossovers. This step requires helicases such as HFM1 and the dimer MSH4-MSH5. Exome sequencing has uncovered composite heterozygous mutations in *HFM1* in a cohort of patients with sporadic POI and SA [39,40], in agreement with the phenotype of the *hfm1*$^{-/-}$ mice. Exome sequencing recently identified a deleterious homozygous donor splice-site mutation in *MSH4* in a case of familial POI. This mutation was associated with the generation of internally deleted MSH4 protein [41]. Similarly, a homozygous mutation in *MSH5* in two sisters with POI has recently been reported [42]. The adverse effect of this mutation was confirmed in a mouse model and proven to impair DNA repair.

The final step of recombination is the resolution of recombination intermediates. The resolution of the double Holliday junctions is believed to rely on the heterodimer MLH1-MLH3, and the exonuclease EXO1. Mice lacking either Mlh1 or Mlh3 are sterile. Human mutations reported in *MLH1* are largely associated with colorectal cancer and Lynch syndrome, with no systematic impact on fertility.

Three RecQ helicases, namely BLM (Bloom syndrome), RECQL4 (RecQ protein-like 4), and WRN (Werner syndrome) are proposed to be involved in meiotic recombination, albeit their

'hotspots' designated by PR domain containing 9 (PRDM9), through the deposition of trimethylation on lysine 4 of histone 3.

Next generation sequencing (NGS): also known as high-throughput sequencing, describes modern sequencing technologies that allow the sequencing of thousands to millions of DNA molecules simultaneously. It allows sequencing multiple genes and multiple individuals at the same time.

Nonhomologous end-joining (NHEJ): a DSB repair pathway often opposed to HR. NHEJ directly ligates broken DNA ends together. It is believed to result in low repair fidelity in the absence of a homologous sequence to guide DNA repair, as in HR.

Ovarian reserve (OR): a term describing the quality and number of resting oocytes within primordial follicles, and considered as a female's reproductive potential.

PI3K/Akt signaling pathway: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) signaling pathway, regulating various stages of folliculogenesis. Studies in most genetic mouse models have revealed an essential role of this pathway in primordial follicle activation.

Primordial germ cells (PGCs): the primary cells that form the progenitors of gametes. PGCs will populate the embryonic gonads and differentiate into either oocytes or spermatocytes.

Whole exome sequencing (WES): sequencing by NGS, the protein-coding region of the human genome (exome) that represents <2% of the genome, but contains most known disease-related variants.

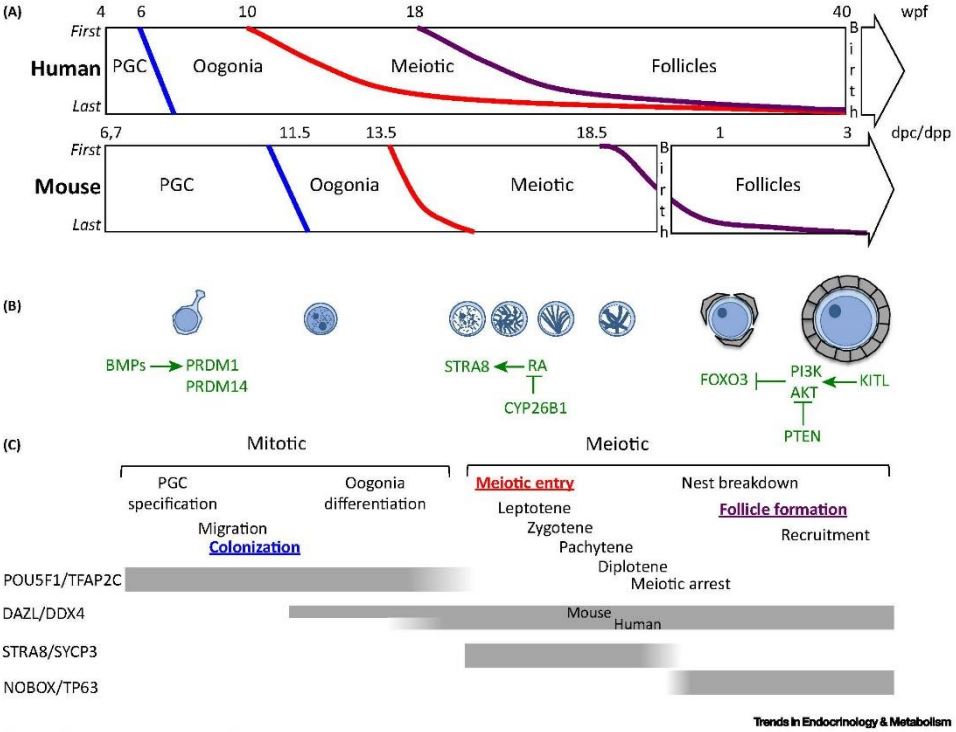


Figure 1. Formation of the Ovarian Reserve in Humans and Mice. (A) Chronology of female germ cell development from primordial germ cell (PGC) specification until follicle formation (purple). Appearance of oogonia and meiotic cells are defined respectively by the blue and red lines [weeks post fertilization (wpf), days post conception (dpc), days postpartum (dpp)]. (B) Schematic presentation of the various germ cell stages. From left to right, migratory PGCs, oogonia, and pre-leptotene-, leptotene-, zygotene-, pachytene-, and diplotene-arrested oocytes in primordial and growing (primary) follicles are presented in blue. Key signaling pathways regulating PGC specification, meiotic entry, and follicle activation are provided in green. (C) Frequently used markers of the various germ cell stages. POU5F1 (OCT4), POU class 5 homeobox 1, and TFAP2C (AP2 γ) are retrieved in PGC and oogonia with stem cell potential. Deleted in azoospermia-like (DAZL) and DDX4 (VASA), DEAD box polypeptide 4, mark the gametogenic competency acquired when mouse germ cells colonize the gonad and later during oogonial differentiation in the human ovary. STRA8 is expressed at the mitotic/meiotic switch, in the pre-leptotene stage, and SYCP3 is a synaptonemal complex protein that labels the axes of the chromosomes during meiotic prophase I. NOBOX, NOBOX oogenesis homeobox, and tumor protein 63 (TP63), are retrieved in the nuclei of diplotene-arrested oocytes enclosed into follicles. BMPs, Bone morphogenic proteins; CYP26B1, cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1; FOXO3, forkhead box O3; KITL, kit ligand; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; PRDM, PR domain containing 1, with ZNF domain (PRDM1/BLIMP1); PTEN, phosphatase and tensin homolog; RA, retinoic acid; STRA8, stimulated by retinoic acid 8.

function in mammals is not fully elucidated. These RecQ helicases are also mutated in human syndromes manifesting in premature aging, cancer, and often POI or reduced fertility [43–45].

Cockayne Syndrome B (*CSB/ERCC6*) encodes a protein involved in DNA repair. A heterozygous mutation in the *CSB*-piggyBac transposable element derived 3 (*PGBD3*) fusion gene-induced POI with the mutated protein exhibiting an altered response to DNA damage [46].

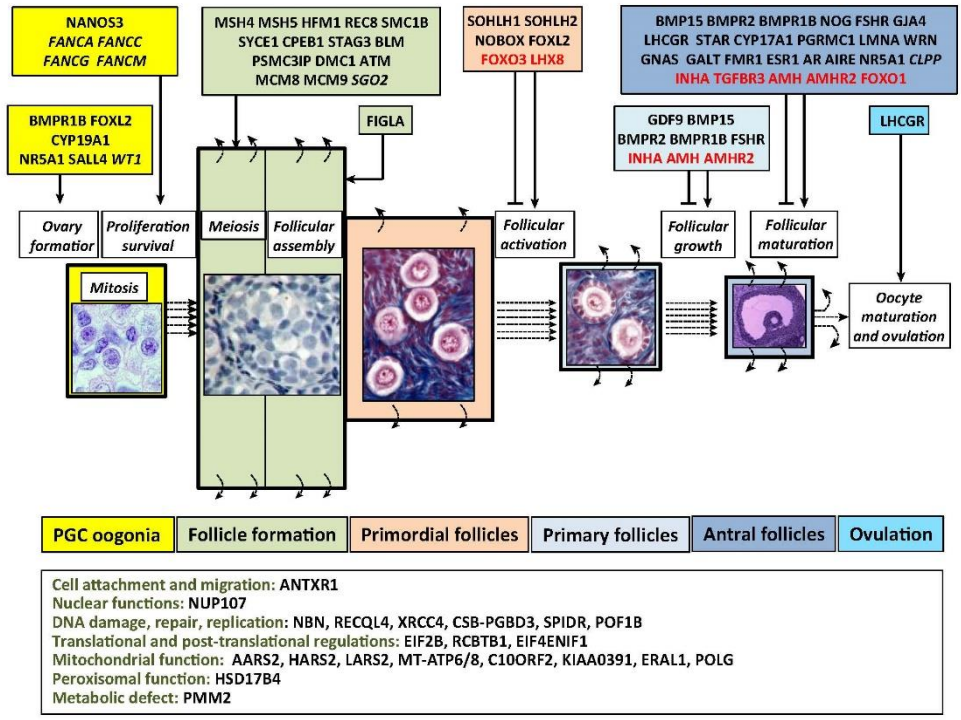


Figure 2. Human Genes Associated with Primary Ovarian Insufficiency and Their Physiological Importance in Oogenesis, Folliculogenesis, and Other Functions. Genes with *in vivo* mutations associated with primary ovarian insufficiency (POI) in humans and the physiological importance of these genes in ovarian function are indicated. Oogenesis and folliculogenic processes are represented by a transit between different compartmental stages, depicted as boxes containing the cell populations. At each stage of oogenesis and folliculogenesis, an important part of the germ cell will die by apoptosis, depicted by a concomitant decrease in box sizes. The first compartment (yellow box) corresponds to the primordial germ cells (PGCs) when they differentiate into oogonia, the second compartment (green box) corresponds to follicle formation, which involves meiosis and follicular assembly processes and ends with establishment of the ovarian reserve of primordial follicles (pink box). From this reserve, follicular activation leads to the formation of primary follicles (light blue box). Then the growing follicles can reach the antral stage (dark blue box) and ovulate, or degenerate by atresia. Genes whose mutations are associated with POI are indicated at each stage of these developmental processes. The involvement of each gene at a specific stage of ovarian or follicular development is based on *in vivo* (presence/absence of follicles in biopsy samples, detection of antral follicles using ovarian ultrasound scanning or AMH measurements in women carrying mutations) or/and *in vitro* observations (culture experiments using human ovarian cortex or granulosa cells). For genes depicted in italic, information on their stage specific role is only available from mouse models. Genes associated with POI for which the stage-specific role is unknown are listed in the box, with their biological function (green font). The stimulating and inhibiting factors are depicted in black and red font, respectively. See text for references and [13].

Lastly, although meiotic DSB repair appears to rely on HR, a second process for DSB repair, the **nonhomologous end-joining (NHEJ)**, allows the direct ligation of broken DNA ends to each other. X-ray repair cross-complementing protein 4 (XRCC4) and Ligase 4 (LIG4) are two proteins absolutely required for NHEJ. Syndromic POI was reported in a female patient with

Table 1. Clinical Presentations of Syndromic POI.[a]

Diagnosis	Menstrual history	Ovarian phenotype	Particular features	OMIM #	Gene(s) involved
WT1-related XX-DSD	PA or SA	Streak gonads, partial ovarian dysgenesis	Nephropathy, diaphragmatic hernia	194070	*WT1*
SF1-related XX-DSD	PA or SA	Streak gonads, partial ovarian dysgenesis	Adrenal insufficiency	612964	*NR5A1/SF1*
BPES	PA or SA	Rare or absent follicles	Blepharophimosis, ptosis, epicanthus inversus	110100	*FOXL2*
FMR1 premutation	SA	Follicle depletion	X-linked mental retardation in family. Fragile X tremor/ataxia syndrome	300624	*FMR1*
Autoimmune polyendocrinopathy syndrome. APS-PGA type 1	PA or SA	Autoimmune oophoritis	Addison disease, candidiasis, vitiligo, hypoparathyroidism, diabetes mellitus, hepatitis, malabsorption, keratopathy, alopecia	240300	*AIRE*
Autoimmune APS-PGA type 3		Autoimmune oophoritis	Autoimmune thyroid disease, atrophic gastritis, vitiligo		
Pseudohypopara thyroidism	SA	Follicular cysts but no corpora lutea in one case	Brachydactyly, short stature, hypocalcemia and hyperphosphatemia, hypothyroidism, obesity	#103580	*GNAS*
Galactosemia	PA	Streak ovaries or few nonmaturated follicles	Neonatal jaundice, failure to thrive, cirrhosis, cataract, intellectual disability, food intolerance, hypoglycemia, renal dysfunction.	230400	*GALT*
Disorders of glycosylation (CDG1A)	PA	Absent ovaries in some patients by US or laparoscopy	Growth retardation, microcephaly, encephalopathy, peripheral neuropathy, retinitis pigmentosa, cardiac myopathy, hepatomegaly, nephrotic syndrome, psychomotor retardation	212065	*PMM2*
Ataxia telangiectasia	PA		Cerebellar ataxia, telangiectasia, recurrent infections, malignancies, and increased levels of alpha fetoprotein	208900	*ATM*
Nijmegen breakage syndrome	PA or SA	Streak gonads, small ovaries	Prenatal growth retardation, progressive mental deterioration, microcephaly, recurrent infections, increased risk for neoplasias such as lymphoma	251260	*NBN*
Fanconi anemia	PA or SA	Decreased number of primordial follicles	Pancytopenia, small stature, microcephaly, ear anomalies, heart defects, kidney malformations, radial aplasia and thumb deformities, intellectual disability, café-au lait-spots	#227650 #227645 #614082	*FANCA* *FANCC* *FANCG*
XRCC4-related disorder	SA		Short stature, microcephaly, developmental delay, diabetes mellitus	#616541	*XRCC4*
Bloom syndrome	SA	Possibly accelerated follicular atresia	Premature aging with chromosomal instability, short stature, skin rashes and telangiectatic skin on sun-exposed areas, increased risk for neoplasias, immunodeficiency	#210900	*BLM*
Werner syndrome	SA	Possibly accelerated follicular atresia	Premature aging with chromosomal instability, pre- and postnatal growth deficiency, sclerodermic skin changes, cataract, arteriosclerosis, increased cancer risk, diabetes mellitus	#277700	*WRN*
Rothmund-Thomson syndrome	SA	Gonadotropin resistance	Short stature, cataract, saddle nose, teeth anomalies, premature graying of hair	#268400	*RECQL4*

Table 1. (continued)

Diagnosis	Menstrual history	Ovarian phenotype	Particular features	OMIM #	Gene(s) involved
Hutchinson-Gilford progeria	SA	Diminished follicular reserve	Progeria, short stature, low body weight, early loss of hair, lipodystrophy, scleroderma, decreased joint mobility, osteolysis, cardiomyopathy	#176670	*LMNA*
GAPO	SA	Follicle depletion	Growth retardation, alopecia, pseudoanodontia, optic atrophy, high forehead, midface hypoplasia	#230740	*ANTXR1*
Perrault syndrome	PA, SA	Streak ovaries, lack of ovaries, small ovaries	Deafness Neurologic symptoms in PRLTS1, PRLTS3, and PRLTS5	#233400 #614926 #614129 #615300 #616138	*HSD17B4, HARS2, LARS2 CLPP C10orf2, CLDN14+ SGO2 KIAA0391 ERAL1*
Woodhouse-Sakati syndrome	PA	Streak ovaries	Alopecia, deafness, hypogonadism, diabetes, intellectual disability	#241080	*C2orf37*
Vanishing white matter disease Ovarioleukodystrophy	SA	Ovarioleukodystrophy streak ovaries	Progressive cerebellar ataxia, spasticity, cognitive impairment with white matter lesions on brain imaging. Onset from early infancy to adulthood	#603896 #615889	*EIF2B* *AARS2*
Retinal dystrophy with or without extraocular anomalies	SA		Retinal dystrophy, goiter, intellectual disability, hypogonadism	#617175	*RCBTB1*
Progressive external ophthalmoplegia	SA	Diminished follicle reserve	Ptosis, progressive external ophthalmoplegia, sensorineural hearing loss, axonal neuropathy, muscle weakness, ataxia, dysarthria, dysphagia and late onset Parkinsonism	#157640	*POLG*
Acromesomelic chondrodysplasia with genital anomalies	PA		Severe brachydactyly with radial deviation of the fingers, ulnar deviation of the hands, fusion of the carpal/tarsal bones, aplasia of the fibula, bilateral clubfeet with small broad feet and short toes	#609441	*BMPR1B*
Interphalangeal joint synostosis	SA		Symphalangism, hearing loss	#185800	*NOG*

[a]DSD, Disorder of sexual differentiation; PA, primary amenorrhea; SA, secondary amenorrhea; US, ultrasound. See text for references and [13].

homozygous single nucleotide variant in the *XRCC4* gene [47]. POI was reported in two patients with biallelic truncating mutations in the *LIG4* gene [48]. These patients display short stature, microcephaly, and genomic instability or hypersensitivity to radiation. Similarly, another important DNA repair pathway, the Fanconi anemia (FANC) pathway, exists in numerous progenitor cells, including the germline. This pathway employs at least 20 proteins, including those encoded by the *FANCA*, *FANC*, and *FANCG* genes, and has been associated with POI [49]. Mouse models for several *Fanc* genes (a, c, d, e, f, g, i, m, n, o, p) evidenced gonadal hypoplasia with ovaries showing follicle depletion [50]. This appears to be due to reduced PGC numbers, though meiotic roles are also possible. Very recently a homozygous *FANCM* mutation was shown to underlie a familial case of nonsyndromic POI [51]. FANCM biallelic mutations predispose to cancer, in particular early-onset breast cancer in females and chemosensitivity

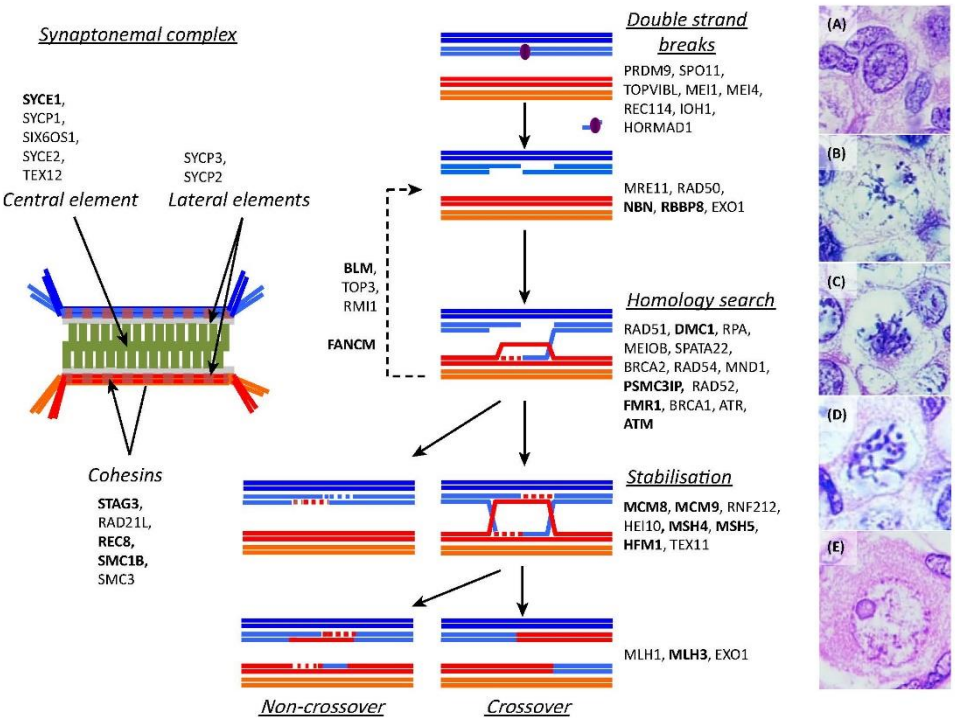


Figure 3. Female Infertility, Meiotic Recombination, and DNA Repair. The various steps of meiotic recombination and the specific genes involved (nonexhaustive, middle panel) are presented in the middle panel. Genes suspected in primary ovarian insufficiency cases are in bold. Left panel shows the structure of the synaptonemal complex required for completing recombination. Right panel presents representative germ cells at oogonial (A), leptotene (B), zygotene (C), pachytene (D), and diplotene (primordial follicle) (E) stages, from human ovaries at 8, 12, 15, 21, and 27 weeks postfertilization, respectively.

[52–54]. These findings clearly support a genetic link between infertility and DNA repair/cancer genes.

The recent identification of a genetic link between POI and tumor/cancer susceptibility genes (*STAG3*, *MCM9*, *FANCM*) makes the genetic diagnosis of all isolated cases of unexplained POI necessary, to perform enhanced genetic counseling and long-term follow-up. Indeed, POI patients can harbor mutations in such 'cancer susceptibility' genes. The large number of genes potentially involved will make these families among the most important involved in POI.

Genes Involved in Syndromic POI (Figures 2 and 3 and Table 1)

The clinical presentations of syndromic POI are highly variable and are presented in Table 1.

Perrault Syndrome (PS)

Perrault syndrome (PS) is a genetically heterogeneous autosomal recessive syndrome, mainly characterized by ovarian dysfunction and sensorineural deafness (Table 1). Recently, a growing number of genes involved in PS were identified by NGS. These genes are implicated in mitochondrial functions or metabolism. In mouse models, genetic changes that cause perturbation in mitochondrial protein translation lead to hearing loss as a result of tissue-specific apoptosis [55]. Given the role of apoptosis in ovarian development, inappropriately timed apoptosis may also lead to POI. *HARS2* [56] and *LARS2* [57,58] encode mitochondrial histidyl or leucyl-tRNA synthetases involved in translation of mitochondrially encoded genes. *CLPP* encodes a highly conserved endopeptidase component of a mitochondrial ATP-dependent proteolytic complex, involved in degradation of unfolded or misfolded polypeptides [59–61]. *C10orf2* encodes Twinkle, a mitochondrial primase-helicase essential for mitochondrial DNA replication [62,63], yielding a mitochondrial DNA depletion syndrome and progressive external ophthalmoplegia. Very recently, mutations of *ERAL1 and KIAA0391* were involved in PS. ERAL1 protein binds to the mitochondrial 12S rRNA and is involved in assembly of the small mitochondrial ribosomal subunit affecting mitochondrial respiration and function [64]. *KIAA0391* encodes RNase P (PRORP) the metallonuclease subunit of the mitochondrial RNase P complex responsible for the 5′-end processing of mitochondrial precursor tRNAs [65].

Apart from mitochondrial functions, mutations in a multifunctional peroxisomal enzyme involved in fatty acid ß-oxidation and steroid metabolism, 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 4 [*HSD17B4*, also known as D-bifunctional protein *(DBP)*] also cause PS [66–68]. Mutations of this gene were already identified in autosomal recessive mode in a severe disorder of peroxisomal fatty acid β-oxidation.

A combination of two homozygous mutations leading to a coincidental PS, one in *CLDN14* involved in deafness and the other in shugoshin-like 2a (*SGO2*) encoding shugoshin2, likely involved in POI, have been described [69]. During meiosis in the mouse, SGO2 maintains the integrity of the cohesion complex that tethers sister chromatids. Unsolved cases of PS persist, indicating that novel genes will still be discovered [70,71].

Premature Aging Syndromes

Laminopathy due to mutations in *LMNA* encoding a nuclear envelope protein includes ovarian failure and premature aging. Malouf syndrome belongs to this condition [72]. Hutchinson-Gilford progeria Syndrome (HGPS) [73], caused by aberrant splicing of the *LMNA* gene and expression of a mutant product called progerin, comprises premature aging and lipodystrophies. Sometimes both syndromes occur together [73].

GAPO syndrome, another form of premature aging and premature follicle depletion, is caused by mutations of the anthrax toxin receptor 1 gene *ANTXR1* [74]. The protein has been involved in cell attachment and migration. Additionally, it allows the interaction of cells and several components of the extracellular matrix by binding extracellular ligands with the actin of the cytoskeleton.

Neurosensory Syndromes

Leukoencephalopathies are also a heterogeneous group of disorders associated with vanishing white matter and are seen in a subset of POI, yielding ovarioleukodystrophy. Mutations of a specific mitochondrial alanine aminoacyl-tRNA synthetase, *AARS2*, have been involved [75,76]. Another group of genes involved is *EIF2B1* to *EIF2B5* which encode the five subunits of the eukaryotic initiation factor 2B [77].

Mutations in *RCBTB1* [78] are present in syndromes including inherited retinal dystrophy and POI. *RCBTB1* is involved in ubiquitination, more specifically as a CUL3 substrate adaptor involved in stress-response to combat oxidative or electrophilic insults.

Mutations of the nuclear gene *POLG* encoding a mitochondrial DNA polymerase gamma can lead to POI with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia [79].

Defects in the respiratory chain or mitochondrial ATP synthase (complex V) result in mitochondrial dysfunction and defective energy production. Mutations of *MT-ATP6/8* encoding two of the subunits of complex V are associated with syndromes including cerebellar ataxia, peripheral neuropathy, diabetes mellitus, and POI [80].

Skeletal Syndromes

POI can occur in some skeletal syndromes, such as Demirhan syndrome, which is caused by mutations in *BMPR1B* [81].

Another condition including proximal symphalangism and POI is caused by mutations in *NOG* [82]. NOG protein is expressed in the ovaries and interacts with BMP, which plays an important role in ovarian function.

Genes Associated With Nonsyndromic POI

See Figures 2 and 3.

Regulation of PF Recruitment

The majority of PF will remain dormant until stimulatory signals or a break from inhibitory signals induces activation. PF recruitment is initiated in mice after birth at postnatal day 4–5, and in humans at 17 weeks of gestation (Figure 1).

Various oocyte-expressed signaling and/or transcription factors have been identified to maintain the quiescent state (Foxo3, Lhx8) or, in contrast, to activate PF growth (Sohlh1, Sohlh2, Nobox) [83] (Figure 2). Interestingly, Foxo3 and Lhx8 are the effectors of the **PI3K/Akt signaling pathway** [84]. Targeted (oocyte-specific) deletion of stimulating factors (Kit, Pdpk1, Rptor, Rps6) of this pathway blocks follicular activation and induces PF apoptosis, whereas loss of the inhibiting factors (Pten, Cdkn1b, Tsc1, Tsc2, Stk11) results in premature and global activation of PF [85] (Figure 2).

A characteristic of PF activation is the transition of squamous pregranulosa cells to cuboidal granulosa cells. Failure thereof results in an arrest at the primordial stage, followed by oocyte death and follicular depletion, as shown in *FoxL2* knockout mice [86]. AMH, expressed during this transition, inhibits PF activation since *Amh* knockout mice display an accelerated exhaustion of the pool [87]. Several additional growth factors have been shown to activate PF recruitment (Figure 2).

Regulation of Follicle Growth

Gonadotropin-Independent Phase: Role of Ovarian Growth Factors; Early follicle growth up to the large preantral stage is independent of gonadotropins in rodents and relies on intraovarian factors (Figure 2). It requires a coordinated dialog between the oocyte and granulosa cells, in which gap junctions and SMAD and PI3K/Akt pathways are important. The discovery that follicles in ovaries of *Gdf9* knockout mice fail to develop beyond the primary stage was the first of a series showing the importance of factors involving SMAD signaling pathway in follicle development [88]. Furthermore, in the oocyte-knockout of *Furin*, a prohormone convertase responsible for proteolytic cleavage of TGFβ family members, follicle growth is arrested at the secondary stage [89]. Likewise, inhibition of the PI3K/Akt pathway by *Kit* or *Kitlg* deletions leads to the blockage of follicular growth at the primary follicle stage. Using targeted deletion or activation of *Igf1*, *Igf1r*, *Irs2*, *Rictor*, or *Foxo3*, it was shown that the PI3K/Akt signaling pathway not only plays a role in PF activation, but also in follicle survival and development beyond the primary stage [90,91] (Figure 2).

Gonadotropin-Dependent Phase: Role of Gonadotropins; The progression through final stages of follicle development depends on the gonadotropins FSH and **luteinizing hormone (LH)** (Figure 2). The threshold for FSH sensitivity is determined by interplay between various stimulatory and inhibitory growth factors, such as IGF1 and various TGFβ family members tipping the balance to either follicle survival or atresia. Deletion of the *Fshr* yields an enhanced rate of atresia and follicles fail to progress to the antral stage [92]. Targeted deletion of the noncanonical progesterone receptor *Pgrmc1* in granulosa cells suppressed antral follicle development and increased atresia [93]. Finally, LH action is indispensable for ovulation, meiotic resumption of the oocytes, and cumulus expansion. Loss of LH action therefore also results in infertility as follicle development is blocked at the antral stage [94]. In the absence of sex steroid action, the final stages of follicle development show abnormalities leading to follicular arrest, as illustrated in mouse models lacking (cell-specific) androgen or estrogen function [95,96].

Defects in Human Genes in Nonsyndromic POI

Interestingly, there is an overlap between genes involved in the onset of puberty, normal reproductive aging, and POI [97]. We will present only recent data or selected examples of genes that illustrate the precaution that must be taken in the interpretation of genetic data and comparison with animal models.

Genes Involved in Establishment of the PF Pool and Maturation to Primary Follicles;

Heterozygous variants of SOHLH1 and SOHLH2 have been found in POI [98]. Interestingly, two families harboring a homozygous single-base deletion in the coding region or a premature stop codon of SOHLH1 [99] had PA, lack of secondary sex characteristics, and nonvisualized ovaries.

A recessive missense mutation in *Nucleoporin-107* was identified in a consanguineous family of Palestinian origin [100]. NUP107 is a component of the nuclear pore complex, and the NUP107-associated protein SEH1 is required for oogenesis in *Drosophila*. In *Drosophila*, Nup107 knockdown in somatic gonadal cells resulted in female sterility, whereas males were fully fertile. *Nup107* mutations may compromise the meiotic DNA damage response, leading to oocyte death.

A heterozygous stop codon was identified in the eukaryotic translation initiation factor 4E nuclear import factor 1 gene *eIF4ENIF1* in familial POI with dominant inheritance in three

generations [101]. The gene plays an important role in oocyte development in organisms from *Drosophila* to mice.

Heterozygous mutations of the Newborn ovary homeobox (*NOBOX*) transcription factor have been reported in women with sporadic POI [28,102,103]. Contrasting with the knockout mouse model, which displays accelerated postnatal oocyte loss due to a defect in germ cell cyst breakdown [104], patients with *NOBOX* mutations may have PA or SA with follicles detected by histology in the ovaries in adulthood [102]. This may be due to the fact that the human mutations caused only partial loss of function *in vitro*. Functional studies are thus critical before any comparison with animal models and before any conclusion on the human physiological role of a gene can be established. Interestingly, a prevalence of 5.6% and 6.2% of heterozygous mutations has been detected in different cohorts, making this gene potentially one of the most frequent causes of POI in humans, provided that causality of the heterozygous variants is proven. Recently, a homozygous truncated variant of NOBOX has been described [105], with complete loss of function *in vitro* in patients with PA, but with no ovarian phenotype. Fertility of the heterozygous mother excludes a mechanism of haploinsufficiency, as previously proposed.

Genes Involved in the Maturation and Growth from Primary to Ovulatory Follicles:

The two steroid hormone receptors, for estrogens (ESR1) and androgens (AR), are positive regulators of follicular maturation. Two families with homozygous mutations of *ESR1* have been described. The probands had PA without breast development, very high estrogen plasma concentrations, and multicystic ovaries [106,107]. Functional studies reveal altered estrogen signaling.

Interestingly, a continuum of phenotypes is associated with *FSHR* mutations, varying from absence of pubertal maturation to normal breast development with SA, according to severity of the receptor inactivation [108–111]. The first mutation described in the Finnish population was associated with the existence of preantral or rare antral follicles in the ovaries [108]. However, functional studies have shown that it was a partial loss of function mutation [112]. A complete loss of function mutation of the *FSHR* has also been described, causing PA and complete block of follicular maturation after the primary stage [113]. Remarkably, there was an increased density of small follicles when compared with an age-matched woman. Thus, the gonadotropin-dependent growth phase in humans starts at the primary follicle stage, contrary to rodents, in which preantral follicles are observed in ovaries of mice deficient in *Fshb* or *Fshr* (see above). Thus caution must be taken before extrapolating data from mouse models to humans. Partial mutations of the *FSHR* are associated with SA and the presence of different sized antral follicles, depending on severity of the mutation [114]. Of note, there is a correlation between the phenotype of the patients and the molecular studies. Because of the existence of follicles in the ovaries, *in vitro* maturation may be obtained and fertility restored ([115] and see below).

Mutations in the other gonadotropin receptor gene, *LHCGR*, cause POI with SA, anovulation, and recurrent cyst formation. In the affected families, disorders of sex differentiation are found in male relatives with hypogonadism due to Leydig cell hypoplasia [116,117].

The first involvement of *BMP15* in POI was reported in an Italian family with 46,XX ovarian dysgenesis [118]. Since then, several heterozygous and one homozygous BMP15 variant have been associated with PA or SA, but streak ovaries without follicles have been found using US, which was interpreted as premature depletion of the OR [118]. Functional studies suggest impaired production of the mature protein or, in some cases, a dominant negative effect [118].

However, most of the variants detected occur in the heterozygous state, and *BMP15* haploinsufficiency was proposed to have a predisposing impact for POI. It was also proposed that reduced BMP15 dosage would contribute to the ovarian phenotype of Turner syndrome patients [119]. These conclusions were challenged by a very recent work on a family with a *BMP15* knockout-like effect [120], with both parents bearing deletions in the proregion of the BMP15 precursor. The heterozygous mother conceived normally and had three children. Thus, it seems that haploinsufficiency is not involved in humans. Most of the mutations of *BMP15* described were heterozygous and a mechanism of haploinsufficiency or a dominant negative effect was suspected but most often not demonstrated, making it impossible to implicate the corresponding gene as the unique cause of POI. Additional genetic mutations in an oligogenic mode of inheritance and/or environmental factors must be involved. Despite streak ovaries, AMH was initially detectable in the two POI sisters bearing both deletions of BMP15, supporting the presence of an OR [120]. Five years later, however, AMH was not detected in both sisters, probably because of exhaustion of the PF pool, and one sister had received an egg donation.

In case POI is due to a block in follicular maturation, urgent fertility preservation is needed to avoid follicular atresia.

A recent study showed a homozygous single-base deletion in the coding region of *GDF9* in POI with PA [121], confirming the causative role of this gene.

Innovative Treatments for POI

The most frequent therapeutic approach of infertility of POI patients is embryo transfer from donated oocytes. Given the complexity of this therapeutic approach, couples requiring oocyte donation should discuss its medical, ethical, legal, and psychological aspects with medical experts. Recently, a new innovative fertility treatment has been developed for POI (Figure 4).

Premature activation of PFs caused by chemotherapy, particularly cyclophosphamide, is a significant cause of the disappearance of follicles from the ovaries. Fertility preservation through tissue cryopreservation before chemotherapy is therefore an important method for preventing POI [122]. Post-treatment, the tissue can be autotransplanted. Infants have been born as a result of the technique.

For cancer patients at high risk of reintroduction of the malignancy, such as leukemia, *in vitro* maturation of follicles all the way to metaphase II oocytes is a much needed therapy that still remains to be developed.

In early stages of ovarian insufficiency there are PFs left in the ovaries. Hence, cryopreservation of ovarian tissue as fertility preservation should be carried out as soon as the risk of follicular decrease has been identified. Although these PFs are inactive, Hovatta *et al.* [123] showed that human ovarian follicles can be activated when ovarian tissue is cut into small pieces and placed in organ culture. Recently, Hippo signaling was identified as the regulatory factor in this activation [5,124]. When residual follicles in ovarian tissue from POI patients were stimulated by cutting the tissue into small pieces, and subsequently exposed to phosphatase and tensin homolog (PTEN) inhibitors and protein kinase B (Akt) activators prior to transplantation, full oocyte maturation can be achieved [125] (Figure 4). Of note, PTEN is also an important tumor suppressor, and therefore its inactivation *in vivo* might be risky. After IVA, the follicles have to be stimulated to grow, and FSH stimulation is used in a similar manner as in ovulation induction or before *in vitro* fertilization treatments. The ovarian tissue has been transplanted back to patients after IVA and healthy infants have been born (Figure 4). This IVA method is useful for those

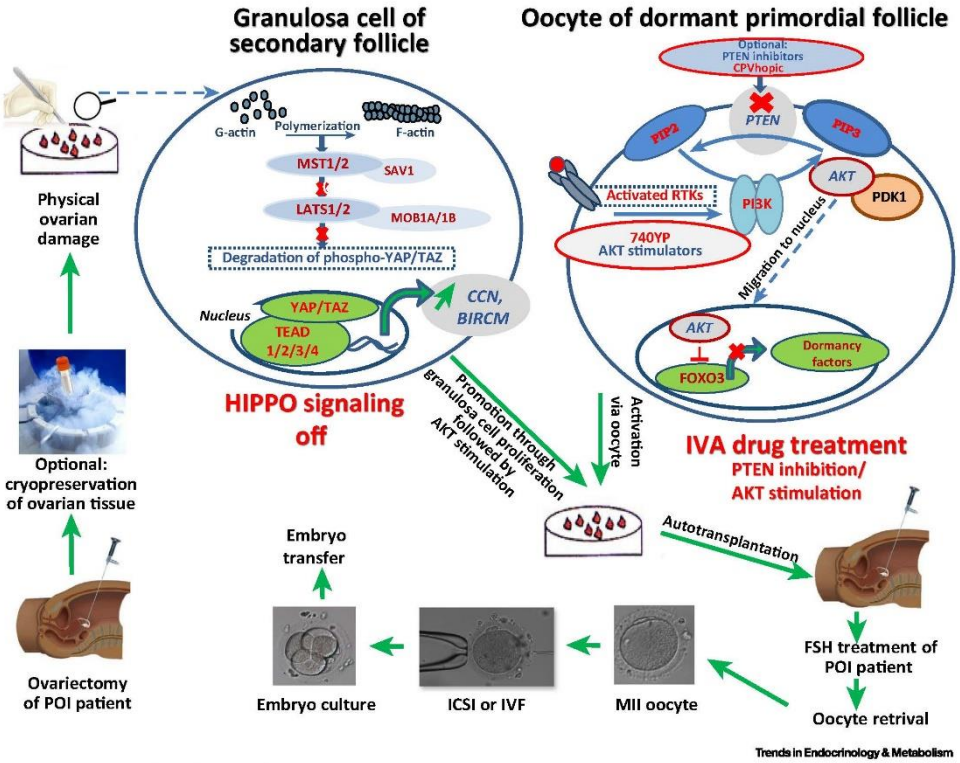


Figure 4. *In Vitro* Activation of Dormant Follicles. Ovarian cortical tissue is laparoscopically biopsied from the woman undergoing primary ovarian insufficiency (POI). The tissue is cut into slices for activation of Hippo signaling and initiation of follicular growth. Sliced tissue is then activated using a PTEN inhibitor or AKT stimulator *in vitro* for 24 hours. Thereafter, the tissue pieces can be transplanted back to the ovary of the donor woman. The activated follicles are stimulated using human recombinant follicle-stimulating hormone (FSH) for 6–10 days, until 15–17-mm sized antral follicles are seen by ultrasonography. The woman will be given human recombinant luteinizing hormone to induce the final maturation of the oocytes. The oocytes are collected 36 hours later using transvaginal ultrasound-guided needle aspiration. They are injected by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with sperm from the partner. The embryos are cultured for 3–5 days and the morphologically best embryo will be transferred to the intravaginal progesterone-treated female partner's womb. The rest of the embryos are cryo-stored for future transfers. IVA, *in vitro* activation; IVF, *in vitro* fertilization.

patients who may have residual follicles left in their ovaries (see flow chart in Figure 5 for POI diagnosis and treatment).

Ultimately, recent technological developments with induced pluripotent stem cells allow the reconstitution of complete oogenesis [126]. Currently this has only been achieved in the mouse, but advances with human cells now make it conceivable for modeling POI and would prove invaluable for supporting genetic diagnosis. In specific cases (e.g., altered follicle recruitment or growth), such models may prove useful for drug screening and selecting the most appropriate treatment.

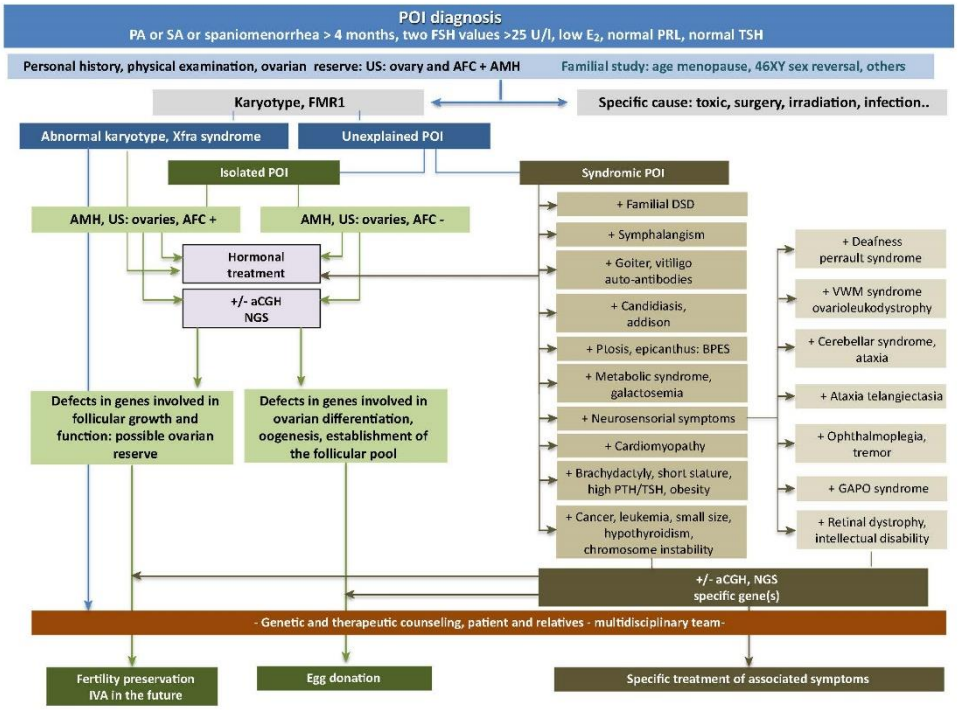


Figure 5. Flow Chart for Primary Ovarian Insufficiency Diagnosis and Treatment. After the initial diagnosis of primary ovarian insufficiency (POI), family investigation and evaluation of the follicular reserve by anti-Müllerian hormone (AMH) assay and antral follicular count (AFC) are performed. Specific causes are eliminated. In the case of unexplained POI, karyotype and FMR1 study are performed. In all cases hormonal treatment has to be started. In isolated POI, array comparative genomic hybridization (aCGH) or next generation sequencing (NGS) can highlight defects in genes involved in ovarian differentiation or in the establishment of the follicular pool. This, together with the undetectable ovarian reserve, will lead to genetic counseling in the patient and relatives and therapeutic counseling for the patient's infertility by a multidisciplinary team. If there is a wish to conceive, egg donation will be performed. In the case of a detectable ovarian reserve and/or a defect in genes involved in follicular maturation, genetic counselling will be performed in the patient and relatives and therapeutic counseling will lead to fertility preservation. In the future, *in vitro* activation (IVA) of small follicles might be performed. In syndromic POI, NGS of specific genes will be performed according to the clinical phenotype of the patient. Specific treatment of associated symptoms is needed. AFC antral follicle count; DSD, disorder of sexual differentiation; FSH, follicle-stimulating hormone; PA, primary amenorrhea; PRL, prolactin; PTH, parathyroid hormone; SA, secondary amenorrhea; TSH, thyroid-stimulating hormone; US,ultrasonography; VWM, vanishing white matter.

Other technological developments, such as tissue engineering to generate ovarian implants, are promising leads that may help restore fertility [127].

Concluding Remarks and Future Perspectives

Taken together, the vast technological advancements have provided valuable new information on the molecular pathophysiology of POI and its new diagnosis and treatment opportunities. Information derived from recent genetic studies has improved the accuracy of POI diagnosis and may reveal new targets for the treatment of infertility or for contraception in the future.

Because of its increased nonreproductive morbidity and mortality (e.g., autoimmunity and tumors) POI should be followed by a multidisciplinary team. The very recent identification of a link between POI and tumor susceptibility makes the genetic diagnosis of all isolated cases of unexplained POI necessary. Also, POI as a genetic disorder becomes amenable to innovative therapies, unlike most other genetic diseases. This obviously necessitates the presence of remnant OR that has to be evaluated besides conventional methods by genetic studies (Figure 5). Indeed, the key question is: what is the state of the follicular pool in the POI patient? The mutated gene may provide important information on the OR, depending on its level of action during either establishment and/or maintenance of the follicular pool, or follicular growth. This belongs to the questions that will need to be answered in the future (see Outstanding Questions).

Acknowledgements

Apologies to those whose related publications were not cited due to space limitations. We thank Alain Gougeon for providing photographs of the different steps of follicular maturation.

References

1. European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI *et al.* (2016) ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum. Reprod.* 31, 926–937
2. Rossetti, R. *et al.* (2017) Genetics of primary ovarian insufficiency. *Clin. Genet.* 91, 183–198
3. Nelson, L.M. (2009) Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N. Engl. J. Med.* 360, 606–614
4. La Marca, A. *et al.* (2013) Prediction of age at menopause from assessment of ovarian reserve may be improved by using body mass index and smoking status. *PLoS One* 8, e57005
5. Zhai, J. *et al.* (2016) In vitro activation of follicles and fresh tissue auto-transplantation in primary ovarian insufficiency patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 4405–4412
6. Vabre, P. *et al.* (2017) Environmental pollutants, a possible etiology for premature ovarian insufficiency: a narrative review of animal and human data. *Environ. Health* 16, 37
7. Craig, Z.R. *et al.* (2011) Endocrine-disrupting chemicals in ovarian function: effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. *Reproduction* 142, 633–646
8. Nilsson, E. *et al.* (2012) Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of ovarian disease. *PLoS One* 7, e36129
9. Silva, C.A. *et al.* (2014) Autoimmune primary ovarian insufficiency. *Autoimmun. Rev.* 13, 427–430
10. Tiblietti, M.G. *et al.* (1999) The idiopathic forms of premature menopause and early menopause show the same genetic pattern. *Hum. Reprod.* 14, 2731–2734
11. Vegetti, W. *et al.* (1998) Inheritance in idiopathic premature ovarian failure: analysis of 71 cases. *Hum. Reprod.* 13, 1796–1800
12. van Kasteren, Y.M. *et al.* (1999) Familial idiopathic premature ovarian failure: an overrated and underestimated genetic disease? *Hum. Reprod.* 14, 2455–2459
13. Qin, Y. *et al.* (2015) Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Hum. Reprod. Update* 21, 787–808
14. Man, L. *et al.* (2017) Fragile X-associated diminished ovarian reserve and primary ovarian insufficiency from molecular mechanisms to clinical manifestations. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 290
15. Baker, T.G. (1963) A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 158, 417–433
16. Guo, F. *et al.* (2015) The transcriptome and DNA methylome landscapes of human primordial germ cells. *Cell* 161, 1437–1452
17. Grive, K.J. *et al.* (2016) TAF4b regulates oocyte-specific genes essential for meiosis. *PLoS Genet.* 12, e1006128
18. Abby, E. *et al.* (2016) Implementation of meiosis prophase I programme requires a conserved retinoid-independent stabilizer of meiotic transcripts. *Nat. Commun.* 7, 10324
19. Bailey, A.S. *et al.* (2017) The conserved RNA helicase YTHDC2 regulates the transition from proliferation to differentiation in the germline. *eLife* 6, e26116
20. Pepling, M.E. (2006) From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis* 44, 622–632
21. Grive, K.J. and Freiman, R.N. (2015) The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. *Development* 142, 2554–2563
22. Chen, Y. *et al.* (2007) Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo. *Endocrinology* 148, 3580–3590
23. Pepling, M.E. and Spradling, A.C. (2001) Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev. Biol.* 234, 339–351
24. Matzuk, M.M. and Lamb, D.J. (2002) Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat. Cell Biol.* 4, s41–s49
25. Baudat, F. *et al.* (2013) Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nat. Rev. Genet.* 14, 794–806
26. Caburet, S. *et al.* (2014) Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N. Engl. J. Med.* 370, 943–949
27. Winters, T. *et al.* (2014) Meiotic cohesin STAG3 is required for chromosome axis formation and sister chromatid cohesion. *EMBO J.* 33, 1256–1270
28. Bouilly, J. *et al.* (2016) Identification of multiple gene mutations accounts for a new genetic architecture of primary ovarian insufficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 4541–4550
29. de Vries, L. *et al.* (2014) Exome sequencing reveals SYCE1 mutation associated with autosomal recessive primary ovarian insufficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E2129–E2132
30. Bolcun-Filas, E. *et al.* (2009) Mutation of the mouse Syce1 gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLoS Genet.* 5, e1000393
31. Lee, K.Y. *et al.* (2015) MCM8-9 complex promotes resection of double-strand break ends by MRE11-RAD50-NBS1 complex. *Nat. Commun.* 6, 7744
32. AlAsiri, S. *et al.* (2015) Exome sequencing reveals MCM8 mutation underlies ovarian failure and chromosomal instability. *J. Clin. Invest.* 125, 258–262

Outstanding Questions

Does investigation of the genetic causes of POI improve our understanding of the regulation of meiosis in mammals? The vast majority of meiotic genes are shared by rodents and primates.

What is the interplay between DNA repair in cancer and infertility? Several genes involved in genomic stability are also associated with infertility. Based on the massive generation of hundreds of DSBs that need repair in each meiotic cell, this might not appear as a surprise. We may even consider that this extraordinary requirement of DNA repair could explain why genetic variants that only mildly impact genetic stability in somatic cells are unraveled in the case of infertility. In this case, a broader consideration of cancer predisposition in families with cases of infertility is likely a wise option.

Can we demonstrate systematically the genetic etiology of POI? It has been proposed that POI might frequently be a multigenic disease. Additionally, the functional demonstration of the pathogenicity of variants can be tedious and also depends on the genetic background. Therefore, induced pluripotent cells could offer a fantastic possibility to ascertain the genetic diagnosis.

Although mouse knockout studies in particular have identified several pathways that play a crucial role in PF recruitment, we still lack full understanding of the mechanisms that control gradual recruitment, as loss of function of the majority of these factors causes global activation of PFs.

How efficient is the *in vitro* activation of dormant follicles on a larger scale? We may reach the answer in the future, when more centers apply and test this. A question has been raised: how do we distinguish such pregnancies from the extremely rare, but not impossible, spontaneous pregnancies among the women with resumptive POI?

Can genetics provide information on the existence of a persistent follicular pool that is small, or comprises only PFs? Recent studies using near-infrared imaging of FSH receptors allowed the monitoring of undetectable

33. Wood-Trageser, M.A. *et al.* (2014) MCM9 mutations are associated with ovarian failure, short stature, and chromosomal instability. *Am. J. Hum. Genet.* 95, 754–762
34. Tenenbaum-Rakover, Y. *et al.* (2015) Minichromosome maintenance complex component 8 (MCM8) gene mutations result in primary gonadal failure. *J. Med. Genet.* 52, 391–399
35. Fauchereau, F. *et al.* (2016) A non-sense MCM9 mutation in a familial case of primary ovarian insufficiency. *Clin. Genet.* 89, 603–607
36. Goldberg, Y. *et al.* (2015) Mutated MCM9 is associated with predisposition to hereditary mixed polyposis and colorectal cancer in addition to primary ovarian failure. *Cancer Genet.* 208, 621–624
37. Mandon-Pépin, B. *et al.* (2008) Genetic investigation of four meiotic genes in women with premature ovarian failure. *Eur. J. Endocrinol.* 158, 107–115
38. Zangen, D. *et al.* (2011) XX ovarian dysgenesis is caused by a PSMC3IP/HOP2 mutation that abolishes coactivation of estrogen-driven transcription. *Am. J. Hum. Genet.* 89, 572–579
39. Wang, J. *et al.* (2014) Mutations in HFM1 in recessive primary ovarian insufficiency. *N. Engl. J. Med.* 370, 972–974
40. Pu, D. *et al.* (2016) Association analysis between HFM1 variation and primary ovarian insufficiency in Chinese women. *Clin. Genet.* 89, 597–602
41. Carlosama, C. *et al.* (2017) A homozygous donor splice-site mutation in the meiotic gene MSH4 causes primary ovarian insufficiency. *Hum. Mol. Genet.* 26, 3161–3166
42. Guo, T. *et al.* (2017) Mutations in MSH5 in primary ovarian insufficiency. *Hum. Mol. Genet.* 26, 1452–1457
43. Fu, W. *et al.* (2017) Human RECQ helicase pathogenic variants, population variation and "missing" diseases. *Hum. Mutat.* 38, 193–203
44. Lu, L. *et al.* (2017) Aging in Rothmund-Thomson syndrome and related RECQL4 genetic disorders. *Ageing Res. Rev.* 33, 30–35
45. Wu, P.-F. *et al.* (2017) A novel splice-site mutation of WRN (c. IVS28+2T>C) identified in a consanguineous family with Werner Syndrome. *Mol. Med. Rep.* 15, 3735–3738
46. Qin, Y. *et al.* (2015) CSB-PGBD3 mutations cause premature ovarian failure. *PLoS Genet.* 11, e1005419
47. de Bruin, C. *et al.* (2015) An XRCC4 splice mutation associated with severe short stature, gonadal failure, and early-onset metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, E789–E798
48. Murray, J.E. *et al.* (2014) Extreme growth failure is a common presentation of ligase IV deficiency. *Hum. Mutat.* 35, 76–85
49. Giri, N. *et al.* (2007) Endocrine abnormalities in patients with Fanconi anemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 2624–2631
50. Fu, C. *et al.* (2016) Primary ovarian insufficiency induced by Fanconi anemia E mutation in a mouse model. *PLoS One* 11, e0144285
51. Fouquet, B. *et al.* (2017) A homozygous FANCM mutation underlies a familial case of non-syndromic primary ovarian insufficiency. *eLife* 6, e30490
52. Michl, J. *et al.* (2016) Interplay between Fanconi anemia and homologous recombination pathways in genome integrity. *EMBO J.* 35, 909–923
53. Bogliolo, M. *et al.* (2017) Biallelic truncating FANCM mutations cause early-onset cancer but not Fanconi anemia. *Genet. Med.* Published online August 24, 2017. http://dx.doi.org/10.1038/gim.2017.124
54. Catucci, I. *et al.* (2017) Individuals with FANCM biallelic mutations do not develop Fanconi anemia, but show risk for breast cancer, chemotherapy toxicity and may display chromosome fragility. *Genet. Med.* Published online August 24, 2017. http://dx.doi.org/10.1038/gim.2017.123
55. Raimundo, N. *et al.* (2012) Mitochondrial stress engages E2F1 apoptotic signaling to cause deafness. *Cell* 148, 716–726
56. Pierce, S.B. *et al.* (2011) Mutations in mitochondrial histidyl tRNA synthetase HARS2 cause ovarian dysgenesis and sensorineural hearing loss of Perrault syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6543–6548
57. Pierce, S.B. *et al.* (2013) Mutations in LARS2, encoding mitochondrial leucyl-tRNA synthetase, lead to premature ovarian failure and hearing loss in Perrault syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 614–620
58. Soldà, G. *et al.* (2016) First independent replication of the involvement of LARS2 in Perrault syndrome by whole-exome sequencing of an Italian family. *J. Hum. Genet.* 61, 295–300
59. Jenkinson, E.M. *et al.* (2013) Perrault syndrome is caused by recessive mutations in CLPP, encoding a mitochondrial ATP-dependent chambered protease. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 605–613
60. Ahmed, S. *et al.* (2015) Exome analysis identified a novel missense mutation in the CLPP gene in a consanguineous Saudi family expanding the clinical spectrum of Perrault Syndrome type-3. *J. Neurol. Sci.* 353, 149–154
61. Dursun, F. *et al.* (2016) A novel missense mutation in the CLPP gene causing Perrault syndrome type 3 in a Turkish family. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* 8, 472–477
62. Morino, H. *et al.* (2014) Mutations in Twinkle primase-helicase cause Perrault syndrome with neurologic features. *Neurology* 83, 2054–2061
63. Oldak, M. *et al.* (2017) Novel neuro-audiological findings and further evidence for TWNK involvement in Perrault syndrome. *J. Transl. Med.* 15, 25
64. Chatzispyrou, I.A. *et al.* (2017) A homozygous missense mutation in ERAL1, encoding a mitochondrial rRNA chaperone, causes Perrault syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 26, 2541–2550
65. Hochberg, I. *et al.* (2017) A homozygous variant in mitochondrial RNase P subunit PRORP is associated with Perrault syndrome characterized by hearing loss and primary ovarian insufficiency. *bioRxiv* Published online July 27, 2017. http://dx.doi.org/10.1101/168252
66. Pierce, S.B. *et al.* (2010) Mutations in the DBP-deficiency protein HSD17B4 cause ovarian dysgenesis, hearing loss, and ataxia of Perrault Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 282–288
67. Amor, D.J. *et al.* (2016) Heterozygous mutations in HSD17B4 cause juvenile peroxisomal D-bifunctional protein deficiency. *Neurol. Genet.* 2, e114
68. Chen, K. *et al.* (2017) A homozygous missense variant in HSD17B4 identified in a consanguineous Chinese Han family with type II Perrault syndrome. *BMC Med. Genet.* 18, 91
69. Faridi, R. *et al.* (2017) Mutations of SGO2 and CLDN14 collectively cause coincidental Perrault syndrome. *Clin. Genet.* 91, 328–332
70. Lerat, J. *et al.* (2016) An application of NGS for molecular investigations in Perrault syndrome: study of 14 families and review of the literature. *Hum. Mutat.* 37, 1354–1362
71. Demain, L.A. *et al.* (2017) Genetics of mitochondrial dysfunction and infertility. *Clin. Genet.* 91, 199–207
72. Şilfeler, D.B. *et al.* (2014) Malouf syndrome with hypergonadotropic hypogonadism and cardiomyopathy: two-case report and literature review. *Case Rep. Obstet. Gynecol.* 2014, 275710
73. Gonzalo, S. *et al.* (2017) Hutchinson-Gilford progeria syndrome: a premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Res. Rev.* 33, 18–29
74. Benetti-Pinto, C.L. *et al.* (2016) GAPO syndrome: a new syndromic cause of premature ovarian insufficiency. *Climacteric* 19, 594–598
75. Dallabona, C. *et al.* (2014) Novel (ovario) leukodystrophy related to AARS2 mutations. *Neurology* 82, 2063–2071
76. Lakshmanan, R. *et al.* (2017) Redefining the phenotype of ALSP and AARS2 mutation-related leukodystrophy. *Neurol. Genet.* 3, e135
77. Lynch, D.S. *et al.* (2017) Clinical and genetic characterization of leukoencephalopathies in adults. *Brain J. Neurol.* 140, 1204–1211
78. Coppieters, F. *et al.* (2016) Isolated and syndromic retinal dystrophy caused by biallelic mutations in RCBTB1, a gene implicated in ubiquitination. *Am. J. Hum. Genet.* 99, 470–480

secondary follicles using US [128]. Identification of the genetic cause could be a possible predictor of an OR if a gene involved in follicular growth is identified. On the contrary, mutations in meiosis or DNA repair genes will most often exclude such a possibility (see flow chart in Figure 5 for diagnosis and treatment of POI).

79. Luoma, P. *et al.* (2004) Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet* 364, 875–882
80. Kytövuori, L. *et al.* (2016) A novel mutation m.8561C>G in MT-ATP6/8 causing a mitochondrial syndrome with ataxia, peripheral neuropathy, diabetes mellitus, and hypergonadotropic hypogonadism. *J. Neurol.* 263, 2188–2195
81. Demirhan, O. *et al.* (2005) A homozygous BMPR1B mutation causes a new subtype of acromesomelic chondrodysplasia with genital anomalies. *J. Med. Genet.* 42, 314–317
82. Kadl, N. *et al.* (2012) Proximal symphalangism and premature ovarian failure. *Joint Bone Spine* 79, 83–84
83. Jagarlamudi, K. and Rajkovic, A. (2012) Oogenesis: transcriptional regulators and mouse models. *Mol. Cell. Endocrinol.* 356, 31–39
84. Ren, Y. *et al.* (2015) Lhx8 regulates primordial follicle activation and postnatal folliculogenesis. *BMC Biol.* 13, 39
85. Reddy, P. *et al.* (2010) Machanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 96–103
86. Schmidt, D. *et al.* (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131, 933–942
87. Visser, J.A. *et al.* (2006) Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 131, 1–9
88. Otsuka, F. *et al.* (2011) Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 9–21
89. Meng, T.-G. *et al.* (2017) Oocyte-specific deletion of furin leads to female infertility by causing early secondary follicle arrest in mice. *Cell Death Dis.* 8, e2846
90. Chen, Z. *et al.* (2015) Rictor/mTORC2 pathway in oocytes regulates folliculogenesis, and its inactivation causes premature ovarian failure. *J. Biol. Chem.* 290, 6387–6396
91. Liu, L. *et al.* (2007) Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. *Dev. Camb. Engl.* 134, 199–209
92. Abel, M.H. *et al.* (2000) The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology* 141, 1795–1803
93. Peluso, J.J. and Pru, J.K. (2014) Non-canonical progesterone signaling in granulosa cell function. *Reproduction* 147, R169–R178
94. Pakarainen, T. *et al.* (2005) Knockout of luteinizing hormone receptor abolishes the effects of follicle-stimulating hormone on preovulatory maturation and ovulation of mouse graafian follicles. *Mol. Endocrinol.* 19, 2591–2602
95. Hamilton, K.J. *et al.* (2014) Estrogen hormone physiology: reproductive findings from estrogen receptor mutant mice. *Reprod. Biol.* 14, 3–8
96. Walters, K.A. (2015) Role of androgens in normal and pathological ovarian function. *Reproduction* 149, R193–R218
97. Perry, J.R.B. *et al.* (2015) Molecular insights into the aetiology of female reproductive ageing. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 725–734
98. Qin, Y. *et al.* (2014) Novel variants in the SOHLH2 gene are implicated in human premature ovarian failure. *Fertil. Steril.* 101, 1104–1109
99. Bayram, Y. *et al.* (2015) Homozygous loss-of-function mutations in SOHLH1 in patients with nonsyndromic hypergonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, E808–E814
100. Weinberg-Shukron, A. *et al.* (2015) A mutation in the nucleoporin-107 gene causes XX gonadal dysgenesis. *J. Clin. Invest.* 125, 4295–4304
101. Kasippillai, T. *et al.* (2013) Mutations in eIF4ENIF1 are associated with primary ovarian insufficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, E1534–E1539
102. Bouilly, J. *et al.* (2011) Novel NOBOX loss-of-function mutations account for 6.2% of cases in a large primary ovarian insufficiency cohort. *Hum. Mutat.* 32, 1108–1113
103. Ferrari, I. *et al.* (2016) Impaired protein stability and nuclear localization of NOBOX variants associated with premature ovarian insufficiency. *Hum. Mol. Genet.* 25, 5223–5233
104. Rajkovic, A. *et al.* (2004) NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 305, 1157–1159
105. Li, L. *et al.* (2017) A homozygous NOBOX truncating variant causes defective transcriptional activation and leads to primary ovarian insufficiency. *Hum. Reprod.* 32, 248–255
106. Bernard, V. *et al.* (2017) Familial multiplicity of estrogen insensitivity associated with a loss-of-function ESR1 mutation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 102, 93–99
107. Quaynor, S.D. *et al.* (2013) Delayed puberty and estrogen resistance in a woman with estrogen receptor α variant. *N. Engl. J. Med.* 369, 164–171
108. Aittomäki, K. *et al.* (1995) Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 82, 959–968
109. Bramble, M.S. *et al.* (2016) A novel follicle-stimulating hormone receptor mutation causing primary ovarian failure: a fertility application of whole exome sequencing. *Hum. Reprod.* 31, 905–914
110. Katari, S. *et al.* (2015) Novel inactivating mutation of the FSH receptor in two siblings of Indian origin with premature ovarian failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, 2154–2157
111. França, M.M. *et al.* (2017) A novel homozygous missense FSHR variant associated with hypergonadotropic hypogonadism in two siblings from a Brazilian family. *Sex. Dev.* 11, 137–142
112. Rannikko, A. *et al.* (2002) Functional characterization of the human FSH receptor with an inactivating Ala189Val mutation. *Mol. Hum. Reprod.* 8, 311–317
113. Meduri, G. *et al.* (2003) Delayed puberty and primary amenorrhea associated with a novel mutation of the human follicle-stimulating hormone receptor: clinical, histological, and molecular studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 3491–3498
114. Meduri, G. *et al.* (2006) Molecular pathology of the FSH receptor: new insights into FSH physiology. *Mol. Cell. Endocrinol.* 282, 130–142
115. Grynberg, M. *et al.* (2013) First birth achieved after in vitro maturation of oocytes from a woman endowed with multiple antral follicles unresponsive to follicle-stimulating hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 4493–4498
116. Fonseca, D.J. *et al.* (2015) Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations. *Fertil. Steril.* 104, 154–162
117. Bentov, Y. *et al.* (2012) A novel luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mutation associated with amenorrhea, low oocyte yield, and recurrent pregnancy loss. *Fertil. Steril.* 97, 1165–1168
118. Persani, L. *et al.* (2014) The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum. Reprod. Update* 20, 869–883
119. Castronovo, C. *et al.* (2014) Gene dosage as a relevant mechanism contributing to the determination of ovarian function in Turner syndrome. *Hum. Reprod.* 29, 368–379
120. Mayer, A. *et al.* (2017) BMP15 "knockout-like" effect in familial premature ovarian insufficiency with persistent ovarian reserve. *Clin. Genet.* 92, 208–212
121. França, M.M. *et al.* (2017) Identification of the first homozygous 1-bp deletion in GDF9 gene leading to primary ovarian insufficiency by using targeted massively parallel sequencing. *Clin. Genet.* 93, 408–411
122. Donnez, J. and Dolmans, M.-M. (2017) Fertility preservation in women. *N. Engl. J. Med.* 377, 1657–1665
123. Hovatta, O. *et al.* (1997) Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum. Reprod.* 12, 1032–1036

124. Kawamura, K. *et al.* (2013) Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 17474–17479

125. Adhikari, D. *et al.* (2012) The safe use of a PTEN inhibitor for the activation of dormant mouse primordial follicles and generation of fertilizable eggs. *PLoS One* 7, e39034

126. Hikabe, O. *et al.* (2016) Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature* 539, 299–303

127. Laronda, M.M. *et al.* (2017) A bioprosthetic ovary created using 3D printed microporous scaffolds restores ovarian function in sterilized mice. *Nat. Commun.* 8, 15261

128. Feng, Y. *et al.* (2017) Live imaging of follicle stimulating hormone receptors in gonads and bones using near infrared II fluorophore. *Chem. Sci.* 8, 3703–3711