



HAL
open science

Caractérisation moléculaire du rôle de FOXL2 et de ses partenaires dans l'ovaire sain et pathologique

Laetitia Herman

► **To cite this version:**

Laetitia Herman. Caractérisation moléculaire du rôle de FOXL2 et de ses partenaires dans l'ovaire sain et pathologique. Génétique. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP7123 . tel-03246869

HAL Id: tel-03246869

<https://theses.hal.science/tel-03246869>

Submitted on 2 Jun 2021

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

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



Université de Paris
ED 562 BioSPC
UMR7592 Institut Jacques Monod

Caractérisation moléculaire du rôle de FOXL2 et de ses partenaires dans l'ovaire sain et pathologique

Par Laëtitia HERMAN

Thèse de doctorat de Génétique

Dirigée par Pr. Reiner Veitia
Et par Dr. Anne-Laure Todeschini

Présentée et soutenue publiquement le 22 septembre 2020

Devant un jury composé de :

Virginie Rouiller-Fabre, PU, CEA, Présidente
Corinne Cotinot, DR, INRAE, Rapportrice
Eric Pailhoux, DR, INRAE, Rapporteur
Francis Poulat, CR, IGH, Examineur
Daniel Vaiman, DR, Institut Cochin, Membre invité



Except where otherwise noted, this is work licensed under
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Titre :

Caractérisation moléculaire du rôle de FOXL2 et de ses partenaires dans l'ovaire sain et pathologique

Résumé :

FOXL2 est un facteur de transcription majeur des cellules de la granulosa, participant à leur différenciation, leur maintien et leurs fonctions. Une mutation spécifique (p.C134W) est retrouvée dans la majorité des formes adultes des tumeurs des cellules de la granulosa. FOXL2 joue donc un rôle à la fois dans l'ovaire sain mais aussi dans l'ovaire pathologique. Pour comprendre son action moléculaire nous avons identifié par des analyses haut-débit ses cibles transcriptomiques directes et indirectes ainsi que ses sites de fixation sur le génome.

Nous avons identifié 1001 gènes cibles et de nouveaux rôles putatifs pour FOXL2. De plus, AKT inhiberait, probablement de façon indirecte, l'activité de FOXL2 sur des gènes impliqués principalement dans la migration cellulaire.

FOXL2 possède de nombreux partenaires parmi lesquels ESR2, SMAD3 et TRIM28, semblent jouer un rôle dans le développement et le maintien des cellules de la granulosa. Nous avons réalisé une analyse des cibles transcriptomiques de ces partenaires et de la fixation de FOXL2, en leurs présences et en leurs absences. Pour ESR2, particulièrement, nous avons identifié de nouvelles cibles impliquées dans le développement, la régulation de la migration cellulaire et l'organisation de la matrice extracellulaire. Nous avons montré que la présence d'ESR2 est nécessaire à une bonne fixation de FOXL2 sur la chromatine et qu'ensemble ils régulent l'expression de plus de 150 gènes. De plus, leur action conjointe permet l'expression de *Phactr1* assurant une migration, une invasion et une adhésion cellulaire correctes.

Dans un second projet, toujours en cours, nous souhaitons caractériser les cibles de FOXL2 p.C134W, au niveau transcriptomique. Des cellules, portant la mutation à l'état hémizygote ainsi que des lignées contrôles WT pour FOXL2, ont été obtenues par CRISPR/Cas9 et analysées par RNAseq. Les résultats obtenus sont prometteurs et permettront de comprendre le rôle de FOXL2 dans ces tumeurs.

Mots clefs :

FOXL2, forkhead, ESR2, Facteur de transcription, régulation transcriptionnelle, ChIP-seq, RNA-seq, ovaire, cellules de la granulosa, cancer des cellules de la granulosa, cancer de l'ovaire.

Title :

Molecular characterization of the role of FOXL2 and its partners in the healthy and pathological ovary

Abstract :

FOXL2 is a major transcription factor in ovarian granulosa cells, involved in their differentiation, maintenance and function. A specific mutation (p.C134W) is found in the majority of adult forms of granulosa cell tumors. Therefore FOXL2 has been described to play a role both in the healthy or pathological ovary. In order to understand its molecular action, we have identified its direct and indirect transcriptomic targets as well as its binding sites on the genome using high-throughput approaches.

We have identified more than 1000 target genes and new putative roles for FOXL2. In addition, AKT is proposed to inhibit, probably indirectly, the activity of FOXL2 on genes mainly involved in cell migration.

FOXL2 has many partners including ESR2, SMAD3 and TRIM28, which are thought to co-regulate FOXL2 targets in granulosa cells. We performed an analysis of the targets of these partners and of the binding of FOXL2 in their presence or absence. For ESR2, in particular, we identified more than 350 targets involved in development, in the regulation of cell migration and the organization of the extracellular matrix. We have shown that the presence of ESR2 is required for FOXL2 binding to chromatin and that they co-regulate the expression of more than 150 genes. Moreover, their joint action controls the expression of *Phactr1* modulating cell migration, invasion and adhesion.

In a second project, still in progress, I wish to characterize the targets of FOXL2 p.C134W, at the transcriptomic level. Cells carrying the mutation at the hemizygous state as well as WT control lines for FOXL2 were obtained by CRISPR/Cas9 and analyzed by RNAseq. The results obtained are promising and will help understand the role of FOXL2 in these tumors.

Keywords :

FOXL2, forkhead factor, ESR2, transcription factor, transcriptional regulation, CHIP-seq, RNA-seq, ovary, granulosa cells, granulosa cell tumors, ovarian cancer.

« Ce qui est incompréhensible, c'est que le monde soit compréhensible. »

Albert Einstein (Comment je vois le monde, 1934)

Remerciements

Table des matières

REMERCIEMENTS	7
TABLE DES MATIERES	9
GLOSSAIRE	13
I.SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	19
I. Introduction générale	19
II. La transcription et sa régulation	21
A. Mécanismes généraux de la régulation transcriptionnelle	21
1) Aspect général de la transcription	21
a) Mise en évidence de la régulation de l'expression génique et de sa régulation	21
b) Initiation, élongation, terminaison	23
c) Devenir de l'ARN messager	24
2) La régulation transcriptionnelle : de l'architecture du noyau à la reconnaissance d'une séquence d'ADN.....	25
a) Les facteurs de transcriptions : effecteurs majeurs de la régulation transcriptionnelle	26
b) De la régulation proximale à la régulation distale : promoteurs et enhancers	30
c) Paysage de régulation et domaines topologiques associés	32
B. Les facteurs de transcription de la famille des forkheads	38
1. Aspect généraux sur les <i>forkheads</i>	38
a) Organisation génomique et conservation des facteurs à domaine <i>forkhead</i>	38
b) Structure des facteurs à domaine <i>forkhead</i>	41
2. Reconnaissance de l'ADN et mécanismes d'actions.....	43
a) Reconnaissance et fixation à l'ADN.....	43
b) Dimérisation et interaction avec des protéines partenaires	43
c) Implications dans les voies de signalisation et régulations par modifications post-traductionnelles.....	44
d) Fonctions des gènes <i>FOX</i>	49

C. Cancer et régulation de la transcription par les forkheads	57
1. Forkhead Box A (FOXA)	59
a) Des facteurs pionniers associés à une dualité cancer-spécifique	59
b) Une instabilité de la prolifération cellulaire : FOXA-médiateur-cohésine dépendante.....	60
c) Un rôle putatif dans la régulation métabolique	60
2. Forkhead Box O (FOXO)	60
a) Suppresseur de tumeurs ou facteurs pro-tumoraux.....	60
b) Contrôle de l'invasion et métastase.....	63
c) Sénescence	64
d) Angiogenèse	65
e) Réponse au stress oxydatif.....	65
2. Forkhead Box M (FOXO)	66
2. Le facteur de transcription FOXL2 dans la fonction ovarienne normale et pathologique.....	69
A. L'ovaire un organe complexe et dynamique.....	69
1. De la gonade indifférenciée à la mise en place de l'ovaire	69
c) Maintien de l'identité ovarienne.....	73
2. Folliculogenèse.....	77
B. Les facteurs forkhead et l'ovaire sain et pathologique.....	83
1. La famille des <i>FOXO</i> : facteurs clés de la croissance folliculaire.....	85
a) Les FOXOs : rôle dans les cellules de la granulosa et répression de la folliculogénèse	85
b) La voie PI3K/AKT et l'inhibition de FOXO dans le contrôle du développement de l'ovocyte et du follicule	88
2. Les facteurs FOXC.....	88
a) FOXC1 : la migration des cellules germinales primordiales et le développement du follicule antral	88
b) FOXC1 et le maintien de la réserve ovarienne	89
4. Cancers ovariens et résistance aux traitements	91
a) Les différents types de cancers de l'ovaire	91
b) FOXC2 : rôle dans la transition mésenchymato-épithéliale, la migration et l'invasion	94
c) FOXA1 et le cancer des cellules épithéliales ovariennes	94
d) Facteurs FOX et la résistance aux chimiothérapies.....	95

C. FOXL2, un facteur de transcription essentiel des cellules de la granulosa	97
1. Le facteur FOXL2 : généralités	97
a) FOXL2 : structure et conservation	99
b) Expression et régulation de FOXL2	100
2. FOXL2 : rôle dans le développement et la mise en place de l'ovaire	105
a) FOXL2 et le maintien des cellules de la granulosa	107
b) Cibles transcriptionnelles et modes d'actions de FOXL2	107
3. FOXL2 et la forme adulte du cancer des cellules de la granulosa	113
3. Projet doctoral	119
II. RESULTATS	121
1. FOXL2 et ses partenaires transcriptionnels dans les cellules de la granulosa	121
A. FOXL2 et ses partenaires dans la fonction de l'ovaire	121
1.Introduction	121
2. Article 1 : A genome-wide exploration of the targets of the transcription factors FOXL2 and ESR2 unveils their implication in cell migration, invasion and adhesion.	123
3. Résultats complémentaires et discussion de l'article 1.....	161
a) FOXL2, ESR2, PHACTR1 et la migration des cellules de la granulosa	161
b) FOXL2, TRIM28 et SMAD3 : rôles et régulations dans les cellules de la granulosa	162
b) FOXL2 et la conformation de la chromatine	173
B. Nouveaux partenaires protéiques de FOXL2 et implication dans le splicing des ARNm	175
1. Introduction	175
2) Article 2 : Conventional and unconventional interactions of the transcription factor FOXL2 uncovered by a proteome-wide analysis.....	177
3) Discussion de l'article 2.....	179
2. FOXL2 et le cancer des cellules de la granulosa	181
A. Introduction	181
B. Projet	181
1. Génération d'un modèle d'étude de cellules de la granulosa	181

a) Stratégie CRISPR utilisée	183
b) Caractérisations génétiques des clones	183
2. Analyses à haut-débit et pistes d'études dans le rôle de la mutation C134W	187
3. La mutation C134W affecte-t-elle la migration des cellules de la granulosa ?	189
a) La mutation C134W est associée à un changement conformationnel de la cellule.	189
4. FOXL2 C134W et l'interaction avec ses partenaires	191
C. Discussion et perspectives	192
1. Mutation oncogénique et défaut d'invasion et d'adhésion	192
2. Analyse des clones WT/- et C134W/-	192
III. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	195
A. FOXL2 : un rôle dans un grand nombre de processus cellulaires dans les cellules de la granulosa	195
B. FOXL2 : une régulation complexe	197
C. FOXL2 et ses partenaires dans la régulation de la transcription et dans la tumorigénèse	197
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	199
ANNEXE	219

Glossaire

Abréviations

Abréviation	Signification
3C	Capture de conformation chromosomale
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BRE	TFIIB Recognition Element
CET	Cellules épithéliales thymiques
CG	Cellule germinale
CIL	Cellules initiateuses de leucémie
CIN	Chromosomal INstability
DBD	DNA binding domain
DCE	Downstream Core Element
DE	Différentiellement exprimé
DPE	Downstream Promoter Element
<i>E. coli</i>	Escherichia Coli
ESE	Exonic Splicing Enhancer
ESS	Exonic Splicing Silencer
FKH	Forkhead
FOX	Forkhead box
FT	Facteur de transcription
GC	Granulosa cells (cellules de la granulosa)
HBH	Hélice-Boucle-Hélice
hnRNP	heterogenous nuclear ribonucleoproteins
JPC	Jour post-coïtal
KD	Knocked-down
KI	Knocked-in
KO	Knocked-out

LMA	Leucémie Myéloïde Aiguë
LMC	Leucémie Myélogène Chronique
ISE	Intronic Splicing Enhancer
ISS	Intronic Splicing Enhancer
MMP	Métalloprotéases de la matrice
MTE	Motif Ten Element
NLS	Nuclear Localization Sequence
PDB	Paire de base
PIC	Complexe de pré-initiation
PTM	Modification post-traductionnelle
PWM	Position Weight Matrix
RNAPI	ARN polymérase I
RNAPII	ARN polymérase II
RNAPIII	ARN polymérase III
ROS	Reactive Oxygen Species
Skp2	protéine 2 associée à la kinase en phase S
SnRNPs	Petites ribonucléoprotéides nucléaires
TAD	Topologically Associated Domain
TFII	Transcription Factor II
TKI	inhibiteurs de la tyrosine kinase
T reg	Cellules T régulatrices
TSS	Transcription Start Site
XCPE1	<i>X core promoter element 1</i>

Symboles des gènes

Le plus souvent, un gène et la protéine pour laquelle il code portent le même nom. Le nom du gène est indiqué en italique. Le nom de la protéine est indiqué en normal. Les noms des gènes humains sont indiqués entièrement en majuscules. Pour les gènes de souris, la première lettre est indiquée en majuscule et les autres sont indiquées en minuscule (y compris la lettre désignant la sous-classe). Pour toutes les autres espèces, la première lettre et la lettre désignant la sous-classe sont en majuscule, les autres lettres sont en minuscule.

Ex : *FOXL2*/FOXL2 = gène et protéine dans l'espèce humaine

Foxl2/FOXL2 = gène et protéine dans l'espèce murine

FoxL2/FOXL2 = gène et protéine dans les autres espèces

Gene name	Gene description	Gene Synonym
ABL1	ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	
AKT	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	PKB
AMH	anti-mullerian Hormone	
BMP	bone morphogenetic protein	
CBX2	chromobox 2	
CDH1	cadherin 1	
CDX2	caudal type homeobox 2	
CREB	cyclic AMP-responsive element-binding protein	
CRP	C-reactive protein	
CTCF	CCCTC-binding factor	
CYP19A1	cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1	
DHH	desert hedgehog	
DMRT1	doublesex and mab-3 related transcription factor 1	
EGF	pro-epidermal growth factor	
EGFR	pro-epidermal growth receptor	
ESR1	estrogen receptor 1	ER-alpha, NR3A1
ESR2	estrogen receptor 2	ER-beta

FGF2	fibroblast growth factor 2
FIGLA	folliculogenesis specific bHLH transcription factor
FOXL2	forkhead box L2
FOXL2, A1, A2,...	forkhead box
FSH	follicle-stimulating hormone
GDF9	growth differentiation factor 9
GREM1	gremlin 1, DAN family BMP antagonist
HOXA5	homeobox A5
IGF1	insulin like growth factor 1
IHH	Indian Hedgehog
JAG1	jagged canonical Notch ligand 1
JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
LATS1	large tumor suppressor kinase 1
LHX9	LIM homeobox 9
MDM2	MDM2 proto-oncogene
MITF	melanocyte inducing transcription factor
NOTCH2	notch receptor 2
NR5A1	nuclear receptor subfamily 5 group A member 1
P53	tumor protein 53
PGR	progesterone receptor
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RSPO1	R-spondin 1
SF1	splicing factor 1
SIRT1	NAD-dependent proteain deacetylase sirtuin-1
SMAD3	SMAD family member 3
SOD2	superoxide dismutase 2
SOX9	SRY-related HMG box 9
SRY	sex determining region Y
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TBP	TATA-box binding protein

TGF β transforming growth factor beta

TRIM28 tripartite motif containing 28 KAP1

WNT4 Wnt family member 4

WT1 WT1 transcription factor

I.Synthèse bibliographique

I. Introduction générale

L'expression d'un gène est définie dans le temps (origine de la cellule, développement) et dans l'espace (type cellulaire, fonction de l'organe auquel la cellule appartient). Le processus de développement permet alors, à partir d'une cellule unique (le zygote), d'obtenir un grand nombre de cellules aux caractéristiques propres (tailles, formes, fonctions, ...) mais partageant un génome essentiellement identique. Si l'information de départ est la même pour toutes les cellules c'est donc que les cellules disposent d'une activité d'*interprétation* qui leur est propre. Aujourd'hui, les techniques à haut-débit de nouvelle génération permettent d'entrer dans les mécanismes fins de la cellule et donnent un nouvel éclairage sur l'analyse de la régulation de la transcription. De nombreux mécanismes interviennent dans cette régulation notamment au niveau de l'ADN et de la chromatine régulant l'accessibilité d'un gène pour la machine de transcription (1). D'autres facteurs indispensables entrent en jeu, les facteurs de transcriptions (FT), et nous sommes aujourd'hui capables d'identifier à l'échelle du génome les sites où ces facteurs se fixent et leurs effets sur le génome. Bien que la régulation de la transcription soit un mécanisme très étudié et connu dans les grandes lignes, chaque type cellulaire et chaque facteur possèdent une régulation qui leur est propre. Les enjeux majeurs se situent aujourd'hui dans l'implication de la transcription et plus particulièrement des FT dans le développement et les cancers (2).

Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressée à un FT essentiel dans le développement et la fonction de l'ovaire, FOXL2. FOXL2 est strictement nécessaire à la différenciation et au maintien de l'identité des cellules de la granulosa, les cellules de soutien de l'ovocyte. J'ai cherché à mieux comprendre, à l'aide de techniques à haut-débit de nouvelle génération, comment FOXL2 régule la transcription dans ces cellules et par quels mécanismes. Notamment, je me suis particulièrement intéressée à la manière dont FOXL2 reconnaissait la chromatine et pouvait coopérer avec d'autres FT, pour assurer des réponses spécifiques au contexte ovarien. J'ai, de plus, mis au point de nouvelles lignées cellulaires de la granulosa afin d'étudier le rôle d'une mutation unique de FOXL2 majoritairement retrouvée dans un type de cancers ovarien par des approches de RNAseq. Mon manuscrit présentera dans un premier temps des notions

générales sur le mécanisme transcriptionnel, puis s'orientera sur la fonction d'une famille particulière de FT, les facteurs à domaine *forkhead*, dans cette régulation. Dans une seconde partie, je discuterai les relations entre transcription et mécanismes cancéreux en restant toujours centré sur le rôle des facteurs à domaine *forkhead*. Puis je finirai par présenter le FT étudié, FOXL2, et son implication dans la fonction ovarienne normale et pathologique, avec une attention plus particulière pour les cellules de la granulosa.

II. La transcription et sa régulation

A. Mécanismes généraux de la régulation transcriptionnelle

1) Aspect général de la transcription

a) Mise en évidence de la régulation de l'expression génique et de sa régulation

Dans les années 1940, Torbjörn Caspersson, à l'aide de techniques de spectroscopie très fines et l'utilisation d'enzymes dégradatives, montre que les chromosomes sont de nature nucléoprotéique alors que le cytoplasme est enrichi en acides ribonucléiques. Il montre même que plus la cellule a une activité métabolique plus son cytoplasme est riche en ARN (3). A la même période Jean Brachet montre lui aussi sur des embryons d'amphibiens que la quantité d'ARN est liée à une activité de synthèse des cellules (4). Il faut cependant attendre 1955 pour que Brachet à l'aide des expériences d'énucléation montre que l'ARN est suffisant pour la synthèse protéique (5). En parallèle, les années 50 voient émerger les premiers travaux sur la régulation génique chez les bactéries. François Jacob et Jacques Monod travaillent notamment sur l'opéron lactose et cherchent à comprendre comment la bactérie *Escherichia Coli* adapte son métabolisme aux conditions environnementales, que sont la présence ou non de glucose ou de lactose. Ils identifient le gène *lacI*, nécessaire à la répression de l'expression des gènes du métabolisme du lactose en l'absence de ce sucre. Ces gènes se trouvent à proximité les uns des autres sur l'ADN (6, 7). Le facteur *lacI* est rapidement identifié comme pouvant lier l'ADN en absence de lactose, alors que la présence de galactose (métabolite du lactose) inhibe cette liaison (8). Ils proposent que ces gènes constituent un opéron (un ensemble de gènes contigus régulés de la même façon) et que le facteur *lacI* réprime l'expression de ces gènes *via* son association à une séquence opératrice adjacente. Des études ultérieures ont permis d'identifier un gène, *CRP*, responsable de l'activation de l'expression de ce même opéron dans des conditions pauvres en glucose (9). Dans le cas de l'opéron lactose, la combinaison de l'activateur et du répresseur permet de n'activer efficacement la transcription que dans des conditions pauvres en glucose et riches en lactose.

Découvertes chez les procaryotes ces protéines capables d'activer ou d'inhiber la transcription ont ensuite été mises en évidence chez les eucaryotes. Récemment le séquençage de nombreux génomes a montré que la complexité d'un organisme n'est pas directement liée au nombre de gènes codants pour des protéines dans son génome ou à la taille de son génome.

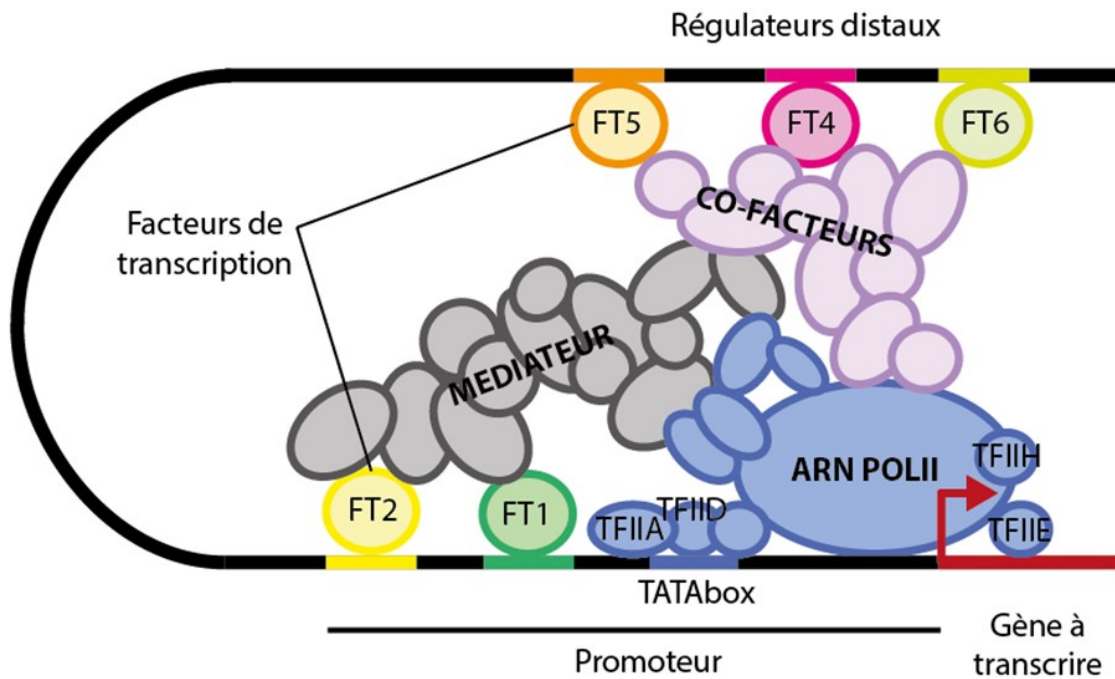


Figure 1 : **Schéma général de l'initiation de la transcription.**

Des séquences spécifiques d'ADN sont reconnues par des facteurs de transcription (FT1,...) aux niveaux d'éléments régulateurs proximaux et distaux. Les FTs interagissent également avec des cofacteurs et le médiateur. Cette interaction va permettre le recrutement et l'assemblage du complexe de pré-initiation (ARN Polymérase II et facteurs généraux de transcription) au niveau du site d'initiation de la transcription.

La transcription régulée des gènes, au moins autant que leur séquence, détermine la diversité des morphologies et des fonctions adoptées par une cellule.

b) Initiation, élongation, terminaison

L'initiation de la transcription est généralement conservée chez les eucaryotes et relativement bien connue par son étude poussée chez la levure (10). Dans le promoteur se trouve le point de départ de la transcription. Lors de l'initiation de la transcription, un complexe enzymatique ARN polymérase s'associe à une région d'ADN bien précise et initie la synthèse d'ARN.

Chez les eucaryotes, il existe trois types d'ARNs polymérases qui diffèrent par leur localisation dans le noyau et la nature des ARNs qu'elles forment :

- ARN-polymérase I (RNAPolI) dans le nucléole pour les ARNr 5, 8, 18 et 28 S.
- ARN-polymérase II (RNAPolII) dans le nucléoplasme pour les ARNm.
- ARN-polymérase III (RNAPolIII) dans le nucléoplasme pour les ARNt, ARNr 5 S et pour les petits ARN.

Nous insisterons principalement dans cette partie sur le fonctionnement de la RNAPolII. Ce complexe ARN polymérase n'est pas capable de reconnaître une séquence particulière pour s'y fixer (11). La transcription nécessite donc d'autres protéines, interagissant avec l'ADN du promoteur, appelées TFII (pour *transcription factor II*, FT interagissant avec la RNAPolII). Chez les eucaryotes, il existe 6 facteurs principaux qui spécifient le site de démarrage de la transcription (en interagissant avec la TATA box notamment lorsqu'elle est présente), procèdent à l'« ouverture » de la double hélice (*via* une activité hélicase) et participent à l'élongation *via* une activité kinase qui phosphoryle l'ARN polymérase II en son domaine Cter. L'ARNPoliI est un complexe constitué de 12 sous-unités protéiques chez l'être humain (nommées Rpb1 à 12). Ces unités permettent à l'ARNPoliI d'avoir son propre centre catalytique et de procéder seule à l'élongation au-delà de +10 après le promoteur (12). D'autres facteurs, appelés facteurs de transcription (FT) se fixent à l'ADN aux niveaux du promoteur ou de régions plus distales, entraînant alors un repli de l'ADN. Ils disposent d'un domaine (ou plusieurs) dit de transactivation ou transrepression permettant le recrutement des facteurs généraux, du médiateur ou de co-facteurs nécessaires à l'initiation de la transcription. (Figure 1).

L'élongation correspond au déplacement de la bulle de transcription le long de la molécule d'ADN et se fait en utilisant le brin 3'-5' comme matrice, catalysant donc la synthèse d'un brin d'ARN 5' vers 3'. La région désappariée est alors de 25 paires de bases. Pendant la transcription, l'ARN forme un court appariement avec le brin matriciel de l'ADN formant une hélice hybride ADN-ARN sur

une dizaine de paires de base. Comme en dehors des phases de divisions cellulaires l'ADN est compacté autour des histones, lors de la transcription, les nucléosomes doivent donc être ouverts. Cette étape est réalisée par un dimère de protéine FACT ("facilitates chromatin transcription") (13). Brièvement, FACT participe au désassemblage du nucléosome en amont de la bulle de transcription en enlevant deux des huit histones (un dimère de l'histone H2A et un dimère de l'histone H2B), rendant l'ADN compacté accessible pour la RNAPII. Ce dimère réassemble ensuite le nucléosome après le passage de la RNAPII.

La terminaison de l'élongation est propre à chaque ARN polymérase. Dans le cas de l'ARNPII, il n'existe pas, à la fin des gènes, de signaux spécifiques pour un arrêt précis (comme pour le start en +1). L'ARNPII peut donc continuer la transcription jusqu'à quelques milliers de paires de bases après la fin « réelle » du gène. Dans les faits, le transcrit est clivé au niveau d'un site interne avant que l'ARNPII ait arrêté la transcription. Dans le cas des gènes codant des protéines, le clivage a lieu en amont d'une séquence AAUAAA (reconnue par la protéine CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor) chez l'humain) et en aval d'une séquence GU-riche (reconnue par la protéine CstF (cleavage stimulation factor chez l'humain) séparées d'environ 40 à 60 paires de base (pdb). CPSF et CstF forment la base d'un complexe plus large à l'origine du clivage (14). Cette coupure, considérée comme la fin du gène, entraîne la libération de la partie déjà transcrite qui va servir de matrice ARN pour les étapes de maturation qui vont avoir lieu après. Le transcrit restant est digéré par une 5'-exonucléase pendant que la RNAPII continue la transcription. Puis l'exonucléase « rattrape » la RNAPII, entraînant sa déstabilisation et permettant l'arrêt de cette phase de transcription.

c) Devenir de l'ARN messenger

Une fois clivé, l'ARN formé va subir plusieurs modifications. Juste après la coupure la polymérase poly(A) catalyse l'addition en 3' d'une queue poly-A sur le pré-ARNm. Cette enzyme fait d'ailleurs partie du complexe de clivage comprenant CPSF et CstF.

Ensuite, les introns sont enlevés par clivage aux niveaux de séquences conservées appelées sites d'épissages. Ces sites sont retrouvés en 5' et en 3' de chaque intron. De façon générale, la séquence ARN excisée commence par un GU en 5' et finit par AG en 3'. Ces séquences consensus ont été montrées comme étant essentielles, une mutation de ces nucléotides affectant le splicing (15). Une autre séquence importante est la boîte de branchement localisée entre 18 et 40 pdb en amont du 3' de l'intron. La séquence de cette boîte est très peu conservée mais est constituée d'une

majorité d'adénine, la séquence typique étant YNYRAY (Y : pyrimidine ; N : A, T, C, G ; R : purine). L'épissage alternatif se déroule en plusieurs étapes et est catalysé par des petites ribonucléoprotéides nucléaires (SnRNPs). La réaction d'épissage consiste en deux réactions de *trans*-estérification successives à la suite desquelles le segment intronique est éliminé et les deux exons successifs associés dans l'ARNm. Plusieurs types de séquences activatrices (exonic or intronic splicing enhancer : ESE, ISE) ou inhibitrices (exonic or intronic splicing silencer : ESS, ISS) participent également à la reconnaissance de l'exon en interagissant avec des protéines riches en sérines et en arginines ou avec des protéines hnRNP (*heterogenous nuclear RiboNucleoProteins*). Ces séquences aident au positionnement du spliceosome.

Rapidement dans l'étude de l'épissage il a été mis en évidence qu'au-delà de l'excision des introns il existe des schémas alternatifs d'épissage avec un unique pré-ARNm pouvant donner différents ARNm fonctionnels (16). La première démonstration d'épissage alternatif a été faite pour l'adénovirus pour lequel un pré-ARNm peut être épissé à différentes jonctions entraînant la création de plusieurs ARNm matures contenant chacun des combinaisons d'exons différentes. Peu après, l'existence de l'épissage alternatif a été montré pour les gènes nucléaires avec comme premier exemple, le gène de l'IgM (Immunoglobuline M) (17). Un autre exemple est le gène *Dscam* (Down Syndrome Cell Adhesion Molecule) chez la drosophile impliqué dans le guidage axonal pendant le développement de système nerveux. L'étude de la séquence de *Dscam* a révélé un grand nombre d'introns qui, grâce à l'épissage alternatif, permet de créer jusqu'à 38 000 ARNm différents. Cette habilité à produire autant d'ARNm pourrait être le résultat d'une diversité nécessaire à la formation d'une structure aussi complexe qu'est le système nerveux (18). L'existence de multiples ARNm matures issus d'un même gène rentre en compte dans la complexité des organismes, comme chez les humains, qui ont relativement peu de gènes (environ 20 000 gènes). En effet, une étude suggère que plus de 90% des gènes humains subissent un épissage alternatif (19).

2) La régulation transcriptionnelle : de l'architecture du noyau à la reconnaissance d'une séquence d'ADN

La transcription est un mécanisme complexe. En effet, nos observations laissent à penser que le destin d'une cellule est majoritairement contrôlé au niveau de la régulation de la transcription, et particulièrement au niveau des étapes préliminaires nécessaires à son initiation. Un contrôle fin à cette étape permet en effet d'éviter que la cellule ne produise trop de produits superflus qui devront par la suite être dégradés. Cela permet alors de libérer les machineries de transcription qui sont

disponibles pour permettre des réponses rapides aux changements dans l'environnement de la cellule. Cependant, en dehors de certains facteurs généraux de la transcription qui reconnaissent spécifiquement des régions dites promotrices en amont des gènes à transcrire, il n'y a pas d'éléments permettant une reconnaissance spécifique des gènes à activer ou à inhiber. De plus il apparaît compliqué qu'un signal génétique unique puisse contrôler l'activation ou la répression de l'expression car pour les différentes cellules d'un organisme multicellulaire, il existe un profil d'expression des gènes défini temporellement et spatialement. La spécificité de la régulation transcriptionnelle fait donc entrer en jeu d'autres facteurs protéiques capables d'interagir avec des séquences spécifiques d'ADN et ainsi signaler les régions génomiques à réguler : les FT.

a) Les facteurs de transcriptions : effecteurs majeurs de la régulation transcriptionnelle

Les FT sont des protéines possédant un domaine de liaison à l'ADN (*DNA binding domain*, DBD) leur permettant de reconnaître spécifiquement une séquence d'ADN sur le génome. Ils disposent également d'un ou plusieurs domaine(s) dit(s) de transactivation ou transrépression permettant le recrutement des facteurs généraux, du médiateur ou de co-facteurs nécessaires à l'initiation de la transcription. On l'a vu précédemment, la découverte et l'étude de ces facteurs se sont faites en parallèle de l'étude de la transcription (cas de l'opéron lactose et du facteur LacI). Depuis, de nombreux facteurs similaires ont été identifiés notamment chez les mammifères lors de l'étude du développement et de la signalisation. Une étude récente comptait 1554 FT dans le génome humain, soit plus de 6% des protéines codées (20).

i. Regroupement en famille sur la base de leur domaine de fixation à l'ADN

Les différents FT ont été classés en familles selon la structure de leur domaine de fixation à l'ADN. Ainsi, à l'heure actuelle, il existe 4 grandes familles de FT :

- Les FT à doigts de zinc ont un domaine de liaison à l'ADN composé d'éléments répétitifs en forme « de doigts de gants » (21). Ils sont composés d'un groupe d'acides aminés conservés qui se lie à un ion zinc afin de stabiliser leur structure. Deux sous-familles de ces protéines sont connues : la famille classique des protéines à doigts de zinc et les récepteurs nucléaires. La partie N-terminale de chaque doigt forme des feuilletts β alors que la partie non conservée C-terminale, formant des hélices α . Cette dernière est responsable de la reconnaissance spécifique de séquences d'ADN au niveau des gènes cibles (22).

- Les FT « leucine zipper » (ou fermeture éclair à leucine) ont un domaine riche leucines, comme leur nom l'indique. Ils se fixent à l'ADN sous forme de dimères exclusivement et sont composés de deux hélices riches en leucines interagissant par des liaisons de type hydrophobe, nécessaire à la formation du dimère. Une seconde région conservée riche en charges positives permet une fixation du FT sur l'ADN (22).
- Les FT « hélice-coude-hélice » ont en commun un motif constitué de deux hélices alpha de 8 à 10 acides aminés chacune séparée par 3 acides aminés formant un coude. Cette région a été identifiée comme étant le domaine de liaison à l'ADN de répresseur de phages (23). Un motif similaire a d'ailleurs été retrouvé dans les homéodomaines (24). Cette famille de gènes à homéodomaines est impliquée, entre autres, dans la régulation des processus développementaux (notamment chez la drosophile où ils ont été particulièrement bien étudiés).
- Les FT « hélice-boucle-hélice » (HBH) ont en commun un motif de 40 à 50 acides aminés comportant deux hélices α séparées par une région de longueur variable en forme de boucle. Ces protéines peuvent former des dimères *via* l'interaction entre les résidus hydrophobes présents sur leurs deux hélices α . Elles contiennent aussi un domaine basique adjacent au domaine HBH qui est nécessaire pour la liaison à l'ADN (22). Ce motif a été mis en évidence dans des protéines impliquées dans le développement et connues pour se lier à l'ADN (25). Parmi ces FT on retrouve les FT à domaine *forkhead* qui seront détaillés dans la partie 1.B.

ii. Reconnaissance et sites de fixation à l'ADN

Les domaines de fixations permettent aux FT d'interagir directement avec l'ADN. Cette interaction se fait au niveau de motifs d'ADN spécifiques. Les motifs sont souvent représentés en logo (26) issu d'un calcul PWM, « position weight matrix » montrant de façon relative la préférence qu'a le FT pour chaque base qui compose le motif (27)(Figure 2A). L'information concernant le motif de fixation à l'ADN est connue pour 30 à 50% des FTs humain (28, 29) et disponible en open-access sur plusieurs bases de données (JASPAR (30), HOCOMOCO(31), etc...).

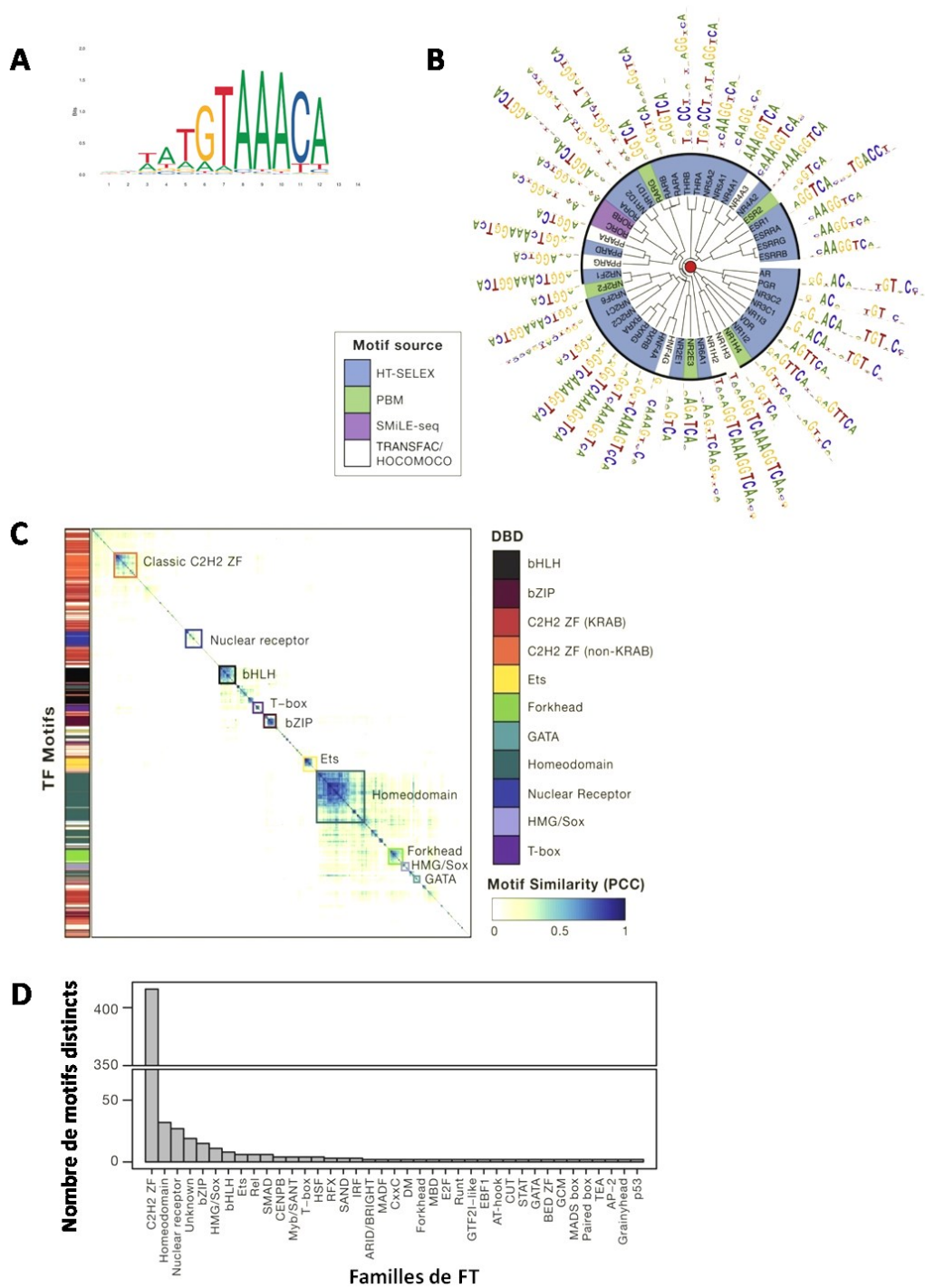


Figure 2 : Les facteurs de transcription se fixent à l'ADN aux niveaux de motifs spécifiques.

A. Exemple de représentation PWM du motif reconnu par FOXL2 chez la souris (généré par JASPAR).
 B. Vue détaillée des motifs reconnus par les récepteurs aux hormones nucléaires (adapté de Ou et al. 2018). Présentation en phylogramme suivant les similarités du DNA Binding Domain en utilisant motifStack.

C. Heatmap présentant les similarités dans les DNA binding motif reconnus par les FTs (adapté de Lambert et al. 2016). Les motifs représentatifs de chaque FT ont été choisis à partir des motifs déterminés par high-throughput *in vitro* assay. Présentation des similarités entre motif deux à deux calculées par MoSBAT et présentées en clustering hiérarchique en utilisant Pearson dissimilarity and average linkage

D. Histogramme présentant le nombre de motifs reconnus par chaque famille de FT (adapté de Lovmar et al., 2005).

Un grand nombre de FT reconnaissent un motif similaire, souvent en lien avec la famille ou la sous-famille dont ils font partie (32, 33) (Figure 2B et 2C). Cependant il existe des variations dans la reconnaissance de ces séquences consensus : reconnaissance en dimère (exemple d'ESR1 et ESR2 sur la Figure 2B) reconnaissance du même motif mais avec préférences variables pour certaines bases. Pour reprendre le même exemple que ci-dessus, les récepteurs aux œstrogènes ESR1 et ESR2, en homodimère ou en hétérodimère, reconnaissent ainsi les séquences palindromiques avec une meilleure affinité (34). Si la majorité des FT reconnaissent un motif assez bien conservé, certaines familles possèdent une grande diversité de motifs démontrant la complexité de la régulation associée au FT (Figure 2D).

Aujourd'hui les nouvelles techniques et notamment l'émergence de la ChIP-seq (35) (puis plus récemment du Cut&Tag (36), Cut&Run (37), ...), ont révolutionné la façon d'appréhender l'étude des FT et de leurs sites de fixation à l'ADN, en permettant une identification sur le génome entier des sites de fixation d'un FT donné. Associés à des études bio-informatiques poussées il est possible désormais d'identifier des similarités de motifs à proximité du site de fixation du FT d'intérêt et d'offrir un nouvel éclairage sur le mode de fixation de ce FT à la chromatine.

iii. Coopération avec d'autres partenaires

Bien que le domaine de liaison à l'ADN soit ce qui caractérise les FT, on sait que les FT agissent *via* l'interaction avec d'autres protéines ou même des ARNs (32, 38). Ainsi, au-delà de la reconnaissance ADN-chromatine, décrite ci-dessus, les interactions protéines-protéines permettent également des changements dans la conformation de la chromatine. Comme nous venons de le voir dans la caractérisation des différentes familles ci-dessus, les FT possèdent souvent, en plus de leur domaine d'interaction à l'ADN, un domaine leur permettant de se dimériser. La possibilité d'engager une interaction en dimère permet alors une reconnaissance sur le génome d'un site plus spécifique avec par exemple deux séquences de fixation à l'ADN séparées par une certaine distance ou une stabilisation du complexe sur son site de fixation. On peut citer l'exemple d'ESR2, présentée ci-dessus où la formation d'un homodimère entraîne la reconnaissance d'une séquence symétrique avec deux « demi-sites » de fixation espacés de trois paires de base (pdb) (39). Au-delà de la dimérisation, la coopérativité existe aussi entre deux FTs distincts appartenant souvent à deux familles différentes (40).

iv. Modèles d'action des facteurs de transcription

Bien qu'un FT puisse se fixer à un grand nombre de loci, le mécanisme régulant son action de FT reste encore à démontrer. En effet, un même FT peut souvent agir sur une grande variété de gènes dans différents types cellulaires, signe de l'existence d'un réseau de régulation très dynamique au sein de l'organisme. La détermination de comment un FT reconnaît un site spécifique, s'y fixe puis régule la transcription, à proximité ou à plus large échelle, nécessite donc de comprendre le rôle moléculaire du FT et de décoder les propriétés du génome qui permettent d'organiser un système de régulations si spécifique à l'échelle de l'organisme entier. L'étude des FT est donc indissociablement liée à l'étude de la transcription.

L'expression des gènes est souvent tissus ou cellules spécifiques. Ce constat est aussi valable pour les FT comme le suggère une étude de 2015 réalisée sur 1554 FTs humains détectés en RNAseq dans 37 tissus adultes différents (20). Cette étude globale montre que l'expression des FT est souvent spécifique à un tissu. Cette différence d'expression spatiale des FT explique donc le rôle différent qu'ils peuvent jouer en fonction des types cellulaires. De surcroît, les associations de FT, ou les dimères FT-protéine, pouvant différer d'un tissu ou un type cellulaire à un autre (expression co-committante des deux facteurs nécessaires) ajoutent un niveau de complexité supplémentaire dans la régulation transcriptionnelle.

b) De la régulation proximale à la régulation distale : promoteurs et enhancers

La régulation de l'expression génique passe par des régions spécifiques qui sont appelées promoteurs et enhancers. Ces régions sont reconnues par divers acteurs de la transcription. Les mécanismes de reconnaissance et d'activation sont présentés brièvement ci-après.

Les promoteurs sont des régions d'ADN situées à proximité du gène. C'est le site de fixation de l'ARN polymérase. Les promoteurs eucaryotes sont composés de plusieurs éléments principaux qui sont de 5' à 3' (Figure 3) :

- L'élément BRE (TFIIB Recognition Element) : site de fixation du FT général de la transcription TFIIB. Cette séquence est en générale présente en amont et en aval de la boîte TATA (ou TATA box)
- La boîte TATA de -30 à -25 en amont du site d'initiation de la transcription (Inr) : site de fixation du facteur général de transcription TFIID et du complexe basal de transcription. Cette boîte est principalement reconnue par la TATA box binding protein (TBP) qui est une sous unité de TFIID.

Ce promoteur minimal n'est pourtant pas très conservé chez les métazoaires et ne permet pas, seul, une régulation précise de l'expression du gène auquel il est associé. La transcription enclenchée *via* ce promoteur minimal est donc modulée par l'action de FT spécifiques qui se fixent sur des régions régulatrices, ou séquences *cis*. Ce type de séquences régulatrices pourraient représenter environ 17 % du génome humain alors que les régions codantes des gènes pourraient n'en représenter que 2,9 % selon une estimation du projet ENCODE. Deux classes de séquences différentes régulent la transcription, les séquences proximales localisées à proximité du TSS entre -110 et -40 pb environ et les séquences distales, localisées à de très grandes distances du promoteur, pouvant activer (enhancers) ou inhiber (silencers) la transcription. La plupart des gènes eucaryotes sont ainsi sous le contrôle de multiples éléments régulateurs.

Au niveau du promoteur, les FT participent à la formation de complexe de pré-initiation de la transcription (ou PIC). Ils participent également au recrutement d'un autre complexe, dit médiateur qui doit également être recruté pour la formation du complexe de pré-initiation. Les protéines du médiateur n'interagissent pas avec l'ADN mais en revanche, interagissent avec l'ARN polymérase et les facteurs généraux de la transcription participant ainsi à leurs assemblages et leurs stabilisations.

Les promoteurs et les enhancers peuvent être très espacés les uns des autres avec des exemples à 1Mb de distance (41). En interagissant avec le PIC, les FT entraînent des repliements spatiaux de l'ADN. De ce fait un même élément peut agir sur plusieurs gènes et un gène donné peut être sous le contrôle d'une combinaison de plusieurs d'éléments.

c) Paysage de régulation et domaines topologiques associés

En plus d'une régulation précise *via* des séquences de reconnaissance, il existe une régulation de la transcription liée à l'état de la chromatine. *In vivo*, l'ADN est compacté autour des histones formant la chromatine. Les histones bloquent spatialement le processus de transcription par un défaut d'accessibilité aux séquences régulatrices pour les différents facteurs. Les protéines des histones possèdent des queues sortant du nucléosome et sur lesquels de nombreux résidus (lysine et arginine principalement) peuvent subir des modifications post-traductionnelles. Ces modifications influencent la compaction de la chromatine, la dynamique du nucléosome et de ce fait la transcription. Un certain nombre de facteurs a été décrit comme pouvant modifier la conformation de la chromatine à proximité de leur site de fixation entraînant un déplacement du nucléosome ou sa déstabilisation. L'action de ces facteurs, dits « pionniers » se fait par un recrutement de

modificateurs de la chromatine (ou par la protection de certaines régions) entraînant un dépôt (ou non) de marques spécifiques de régulation sur les histones.

L'analyse des régions enhancers et promotrices par CHIP-seq avec des anticorps dirigés contre les différentes marques d'histones a montré que les marques H3K4me1, H3K4me3 et H3K27ac étaient associées à un nucléosome hyper-mobile et donc principalement présents aux niveaux des régions promotrices et enhancers (42). La marque H3K4me3 serait plus enrichie au niveau du promoteur, les marques H3K4me3 et H3K27ac étant plutôt présentes au niveau des régions enhancers (43) (Figure 4).

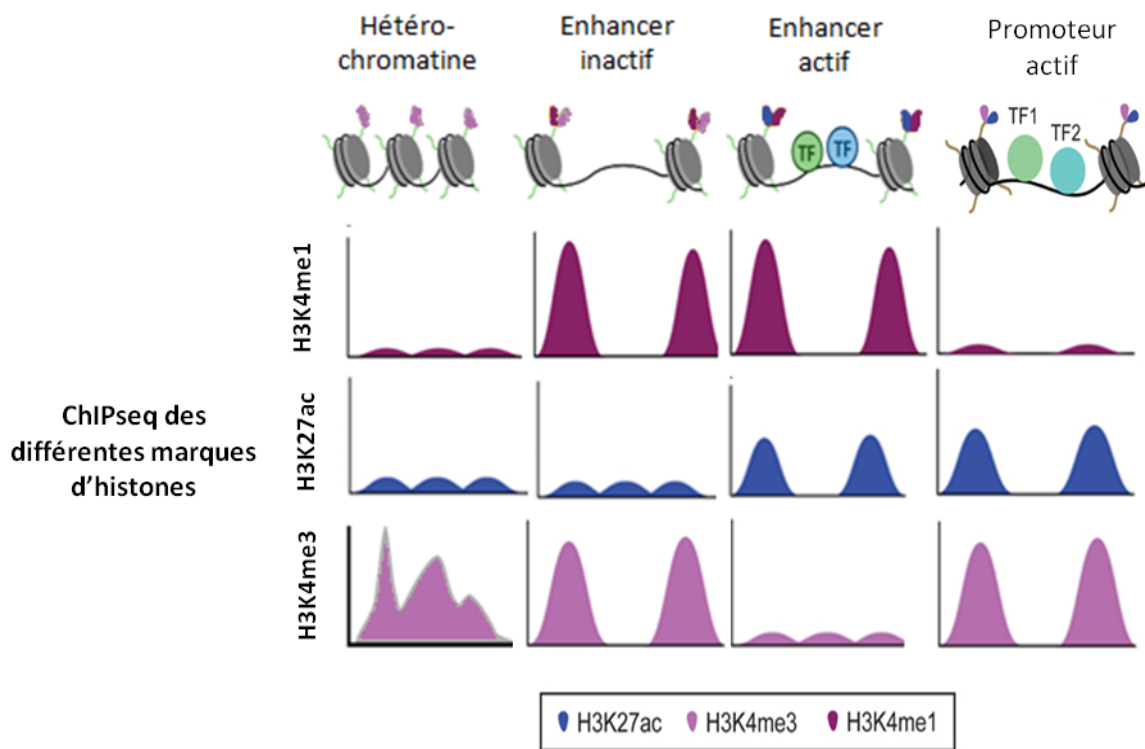


Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation de la chromatine et marques d'histones associées dans l'hétérochromatine, dans les enhancers actifs et inactifs et dans les promoteurs actifs.

H3K4me1 est une marque d'histones associée aux régions enhancers. H3K27ac est une marque d'histones associées à une activité à la fois dans les enhancers et dans les promoteurs. La marque H3K4me3 est associée uniquement aux promoteurs actifs alors qu'elle est la marque d'un enhancer inactif.

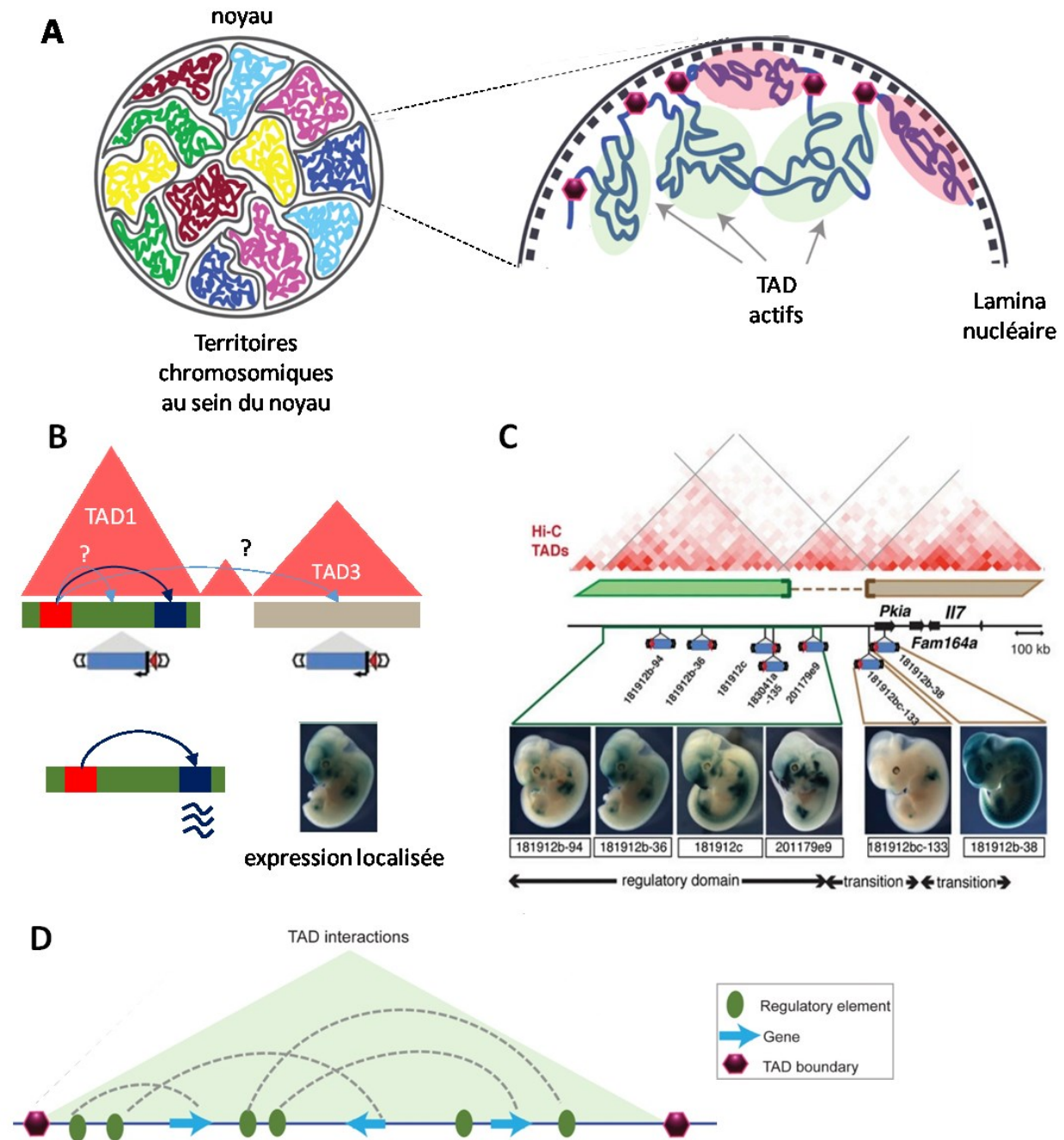


Figure 5 : **Organisation de la chromatine en domaines topologiques.**

A. Représentation schématique des compartiments formés par l'interaction de l'ADN avec lui-même.

B. Représentation schématique de la stratégie utilisée pour mettre en évidence l'effet d'un élément régulateur au sein d'un même domaine ou de deux domaines différents. L'enhancer (rouge) induit une expression localisée du gène bleu. L'insertion de gènes rapporteurs permet d'analyser la zone soumise à l'effet de l'enhancer.

C. Des insertions multiples dans l'intervalle chr3:7.3-8.3M ont délimité un domaine de régulation étendu caractérisé par une expression commune dans le mésenchyme du visage et du tronc, et dans les dérivés de la crête neurale. Ce domaine s'étend dans la région non structurée adjacente (insertion 201179e9), mais deux insertions télomériques, situées dans un TAD différent, ont montré des motifs différents (l'expression du membre proximal est antérieure, alors que les insertions dans le TAD flanquant ont une expression plus médiane), définissant deux zones de transition.

D. Représentation schématique de la régulation d'un pool de gènes au sein d'un TAD.

A l'échelle du génome, des études de capture de conformation chromosomale (3C)(44, 45), ont montré que l'ADN interagit avec lui-même formant deux types de compartiments spatiaux séparés, associés soit à une chromatine dite « ouverte » soit à une chromatine dite « fermée » (46) (Figure 5A). Des techniques encore plus résolutes ont ensuite montré que les chromosomes mammifères sont organisés en domaines, appelés domaines topologiques associés (ou TAD pour Topologically Associated Domain) qui interagissent plus ou moins fortement entre eux (47, 48). Ces TAD ont ensuite été subdivisés en sous-TAD de tailles plus petites (49). Les TAD ont alors été proposés comme étant la base structurale des territoires de régulations. En 2014, des insertions, à plus d'une centaine de loci aléatoires, de gènes rapporteurs dans le génome murin a montré que la capacité d'activation des éléments *cis*-régulateur s'étendait sur de larges domaines et que ces domaines correspondaient aux TAD déjà définis (50) (Figure 5B et C). Cette expérience a mis en évidence le fait que les TAD déterminent un répertoire de gènes régulés par les enhanceurs présents. Cela implique que les enhanceurs ont une activité restreinte à un nombre de loci (Figure 5D).

Alors que certains promoteurs répondent à plusieurs enhanceurs d'autres ne sont activés que par la présence d'une séquence spécifique. De plus un enhancer unique peut induire l'expression de plusieurs gènes avec des spécificités spatiales ou temporelles. Enfin, et ajoutant un niveau de complexité supplémentaire dans cette régulation, des « super-enhancers », régions très denses en enhanceurs reconnus par plusieurs FT, impliqués principalement dans l'identité cellulaire ont été mis en évidence (51). Si on envisage la proximité entre promoteur et enhancer nécessaire à la transcription, les TAD apparaissent comme les domaines privilégiés pour ce genre d'interaction de par leur conformation. En 2016, Symmons et *al.*, utilisant le TAD contenant le gène *Shh* et une série de réarrangements chromosomiques ont montré que la distance intra-TAD entre l'enhancer et le promoteur n'avait pas d'importance dans la régulation génique, mais qu'en revanche lorsque le TAD en lui-même est affecté, l'effet de l'enhancer sur la transcription devient dépendant de la distance entre lui et le promoteur (52). Ces résultats montrent que la proximité intra-TAD favorise l'activation de la transcription. D'autres études proposent que le TAD crée une contrainte qui permet de garder les facteurs nécessaires à la transcription suggérant que les gènes d'un même TAD répondent de la même façon à un même facteur. Ce type de régulation a notamment été montré pour la progéniture sur une lignée de cellules cancéreuses du sein (53).

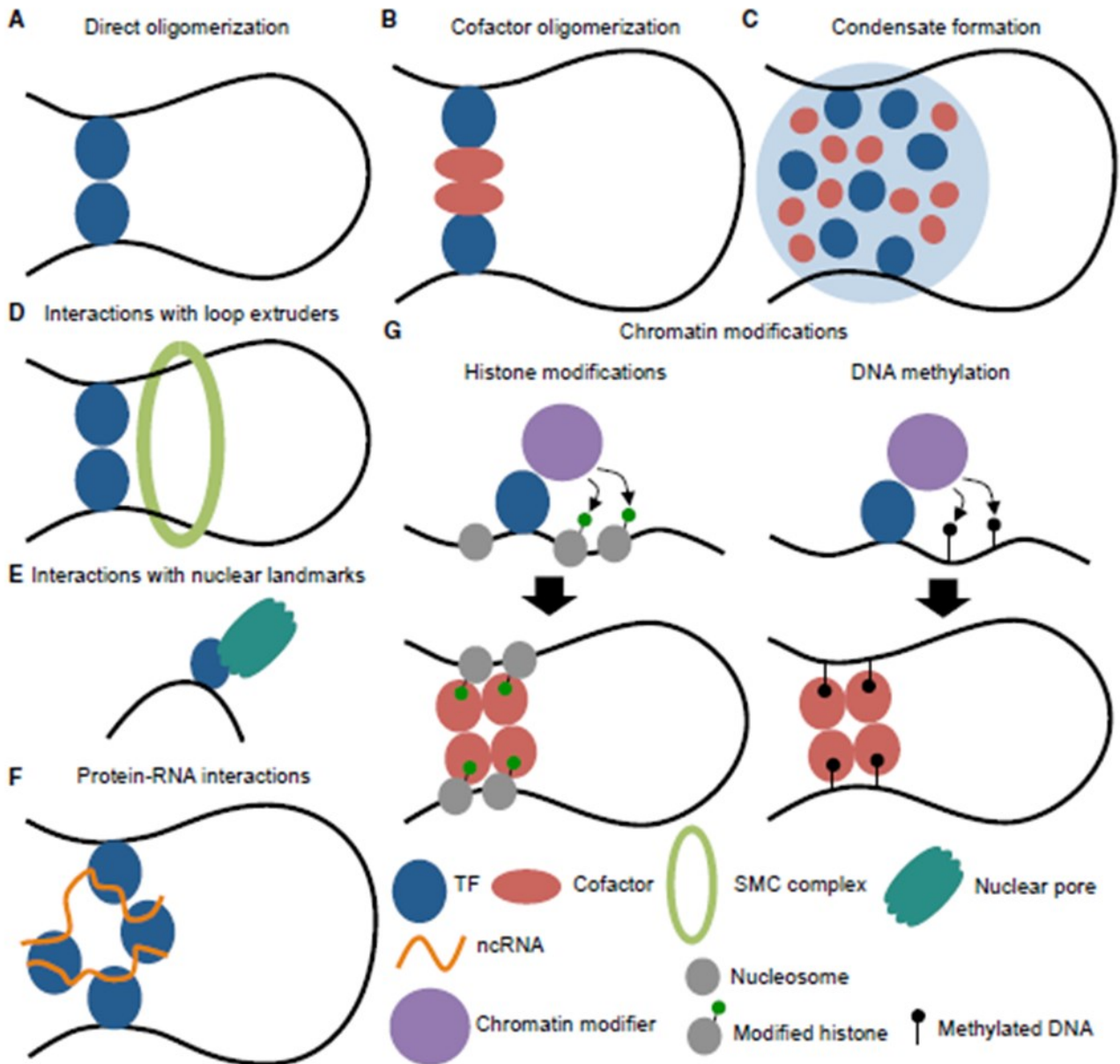


Figure 6 : Schéma récapitulatif des modifications de la structure de la chromatine dues aux FTs.

A. Dimérisation de deux FTs (homodimérisation ou hétérodimérisation).

B. Interaction avec des cofacteurs qui se dimérisent.

C. Formation de condensat. Interaction faible entre plusieurs protéines et molécules provoquant un réarrangement de la région.

D. Interactions avec les hélicases.

E. Interactions avec des points de repère nucléaires tels que les pores nucléaires ou la laminine.

F. Interactions protéines-ARN.

G. Modifications de la chromatine, y compris modifications d'histones (panel de gauche) et la méthylation de l'ADN (panel de droite).

Comme nous venons de le voir, les FT jouent un rôle majeur dans la régulation de l'expression génique et dans l'organisation structurel du génome par plusieurs mécanismes qui ont été détaillés précédemment ou non et qui sont récapitulés dans la Figure 6. L'identification des FT impliqués dans un processus cellulaire, leurs façons de reconnaître l'ADN et leurs impacts suite à cette fixation permettent de comprendre le destin d'un type cellulaire et ouvre des pistes sur la compréhension des maladies génétiques et les cancers dans lesquels la régulation de la transcription est très souvent affectée. Dans la partie suivante, nous allons rentrer plus dans les détails de la régulation transcriptionnelle associée aux FT de la famille des *forkheads* (facteurs *FOX*). Cette famille composée de 50 facteurs dans l'espèce humaine (44 chez la souris) possède un même domaine de fixation à l'ADN de type « hélice-coude-hélice ». Ces FT sont impliqués dans un grand nombre de processus biologiques dans une large diversité de types cellulaires. Leur étude est donc, à nos yeux, représentative du fonctionnement des FT.

B. Les facteurs de transcription de la famille des forkheads

1. Aspect généraux sur les *forkheads*

Les FT à domaines *forkhead* (*FKH*) ont été mis en évidence en 1989 chez la drosophile (54). Une protéine est alors identifiée comme un facteur nucléaire mais ne présente aucune homologie avec les FT déjà décrits. En 1990, un domaine de liaison à l'ADN présentant une forte homologie avec cette protéine est identifié chez les mammifères (*HNF3*) suggérant qu'une nouvelle famille de FT a été mise en évidence (55). Indépendamment toujours en 1990, un second groupe caractérise la protéine *FOXA1* chez le rat (56).

a) Organisation génomique et conservation des facteurs à domaine *forkhead*

La famille de facteurs *FOX* comprend 50 gènes chez l'être humain (plus deux pseudogènes, *FOXO1B* et *FOXO3B*) et 44 gènes chez la souris, séparés en sous-familles (Table 1). L'organisation des *FOX* n'est pas aléatoire dans le génome. Chez l'humain, vingt-cinq gènes sont répartis en neuf groupes de gènes (sur les chromosomes 1, 6, 9, 12, 14, 16, 17 et X) (57). Ce type d'organisation, en clusters conservés au cours de l'évolution est en générale associée à des gènes ayant un rôle fonctionnel proche et une régulation similaire (exemple des homéobox (*HOX*)). Pour les facteurs *FOX*, ces clusters sont plus éclatés avec seulement quelques gènes associés, en concordance avec le fait que les facteurs *FOX* présentent des rôles fonctionnels très variables (voir ci-après). Les localisations chromosomiques des orthologues des gènes *Fox* des différentes espèces sont généralement conservées.

Le domaine *FKH* est lui aussi conservé entre espèce et au sein des sous-familles. Ce domaine est d'ailleurs majoritairement utilisé dans les études de phylogénie de ces facteurs. Des études fondées sur la séquence entière des protéines *FOX*, ont montré un pourcentage d'homologie très fort entre les protéines humaines et leurs orthologues murins (Table 1) avec pour seule exception, *FOXD4*. La protéine murine *Foxd4* se regroupe avec sept protéines humaines (*FOXD4* et *FOXD4-like* de 1 à 6) et partage l'homologie la plus forte avec *FOXD4L1*. Les duplications ayant données naissance au groupe de gènes *FOXD4* sont apparues récemment, pendant l'évolution des hominidés, et peu d'informations sont disponibles sur ces protéines (58).

Table 1 : Liste des gènes FOX chez l'humain et la souris, localisations chromosomiques et pourcentage de similarités entre la protéine humaine et son orthologue murin.

Humain		Souris		
Protéine	Chromosome	Orthologue	Chromosome	% Similarité
FOXA1	14q12-q13	Foxa1A	12	96,2
FOXA2	20p11	Foxa2	2	97,4
FOXA3	19q13.2-q13.4	Foxa3	7	90,4
FOXB1	15q22	Foxb1	9	99,7
FOXB2	9q21.2	Foxb2	19	92,6
FOXC1	6p25	Foxc1	13	95,1
FOXC2	16q24.1	Foxc2	8	92,6
FOXD1	5q12-q13	Foxd1	13	85,8
FOXD2	1p34-p32	Foxd2	4	94,3
FOXD3	1p31.3	Foxd3	4	90,8
FOXD4	9p24.3			
FOXD4L1	2q14.1	Foxd4	19	63,7
FOXD4L2	9p12			
FOXD4L3	9q13			
FOXD4L4	9q13			
FOXD4L5	9q13			
FOXD4L6	9q12			
FOXE1	9q22	Foxe1	4	91,2
FOXE3	1p32	Foxe3	4	79,3
FOXF1	16q24	Foxf1	8	97,4
FOXF2	6p25.3	Foxf2	13	94,6
FOXG1	14q11-q13	Foxg1	12	96,3
FOXH1	8q24	Foxh1	15	76,3
FOXI1	5q34	Foxi1	11	89,9
FOXI2	10q26.2	Foxi2	7	78,6
FOXI3	2p11.2	Foxi3	6	84,5
FOXJ1	17q25.1	Foxj1	11	94,5
FOXJ2	12p13.31	Foxj2	6	93,2

FOXJ3	1p34.2	Foxj3	4	96,5
FOXK1	7p22	Foxk1	5	92
FOXK2	17q25	Foxk2	11	95
FOXL1	16q24	Fokl1	8	73
FOXL2	3q23	Foxl2	9	96,8
FOXM1	12p13	Foxm1	6	88,6
FOXN1	17q11-q12	Foxn1	11	90,9
FOXN2	2p22-p16	Foxn2	17	48
FOXN3	14q24.3-q31	Foxn3	12	90
FOXN4	12q24.12	Foxn4	5	86,2
FOXO1	13q14.1	Foxo1	3	95,4
FOXO3	6q21	Foxo3	10	96,1
FOXO4	Xq13.1	Foxo4	X	93,3
FOXO6	1p34.2	Foxo6	4	86
FOXP1	3p14.1	Foxp1	6	94,6
FOXP2	7q31	Foxp2	6	99,7
FOXP3	Xp11.23	Foxp3	X	91,4
FOXP4	6p21.1	Foxp4	17	80,5
FOXQ1	6p25	Foxq1	13	93,6
FOXR1	11q23.3	Foxr1	9	77,7
FOXR2	Xp11	Foxr2	X	73
FOXS1	20q11.1-q11.2	Foxs1	2	83,3

Les gènes *FOX* ont des tailles et un nombre d'introns très variables. Certains sont mono-exoniques comme *FOXL2* et *FOXO1*. D'autres sont très grands avec de larges introns comme *FOXO1* et *FOXO3* (59). Les gènes *FOX* peuvent être à l'origine de plusieurs transcrits par épissage alternatif, polyadénylation alternative ou initiation de la transcription à des sites variables (60).

b) Structure des facteurs à domaine *forkhead*

En 1993, la structure cristalline du domaine *FKH* a été résolue pour FOXA1 (61). Depuis d'autres structures ont été résolues, dont des domaines de fixation à l'ADN, pour FOXA2, FOXC2, FOXK1, FOXK2, FOXM1, FOXO1, FOXO3, FOXO4, FOXP1 et FOXP2. En 2000, les gènes/protéines possédant un domaine de fixation à l'ADN à « hélice ailée » (winged helix) ont été regroupés sous le terme *FKH* et divisés en sous-familles de FOXA à FOXO (62). Puis de nouveaux gènes ont été décrits incluant les facteurs de FOXP à FOXS. Le domaine *FKH* consiste en trois hélices alpha, trois feuillets bêta et deux larges boucles (région « ailée ») entourant les trois feuillets-bêta (63). Les hélices α et les feuillets β sont très conservés et les variabilités structurales apparaissent le plus souvent entre la deuxième et la troisième hélice.

En plus de permettre la liaison à l'ADN, le domaine *FKH* contient souvent des séquences de localisation nucléaire (NLS) nécessaires à l'adressage et l'importation de la protéine dans le noyau où elle assure sa fonction de FT. Ces séquences NLS peuvent aussi être présentes en dehors du domaine *FKH*.

Les régions effectrices (de *trans*-activation ou *trans*-répression) sont, en général, peu conservées entre les différents facteurs *FOX*, donnant ainsi une spécificité fonctionnelle à chaque *FOX* (60).

La Figure 7A récapitule l'organisation des domaines pour cinq protéines *FOX* (FOXA1, FOXC1, FOXM1, FOXO1 et FOXP1). Nous pouvons y voir que les facteurs *FOX* présentent un grand nombre de similarités, notamment au niveau de leur domaine *FKH*, qui ont permis de les regrouper en famille puis en sous-famille. Cependant ces facteurs présentent aussi des variations dans leurs organisations géniques qui pourraient expliquer qu'ils jouent tous un rôle qui leur est propre. Dans la partie suivante, je vais présenter ce qui les regroupe, en insistant sur le domaine de fixation à l'ADN, puis je vais insister sur leurs différences, en présentant leurs capacités à interagir avec certains partenaires et à réguler un grand nombre de processus spécifique à chaque famille ou même à un facteur.

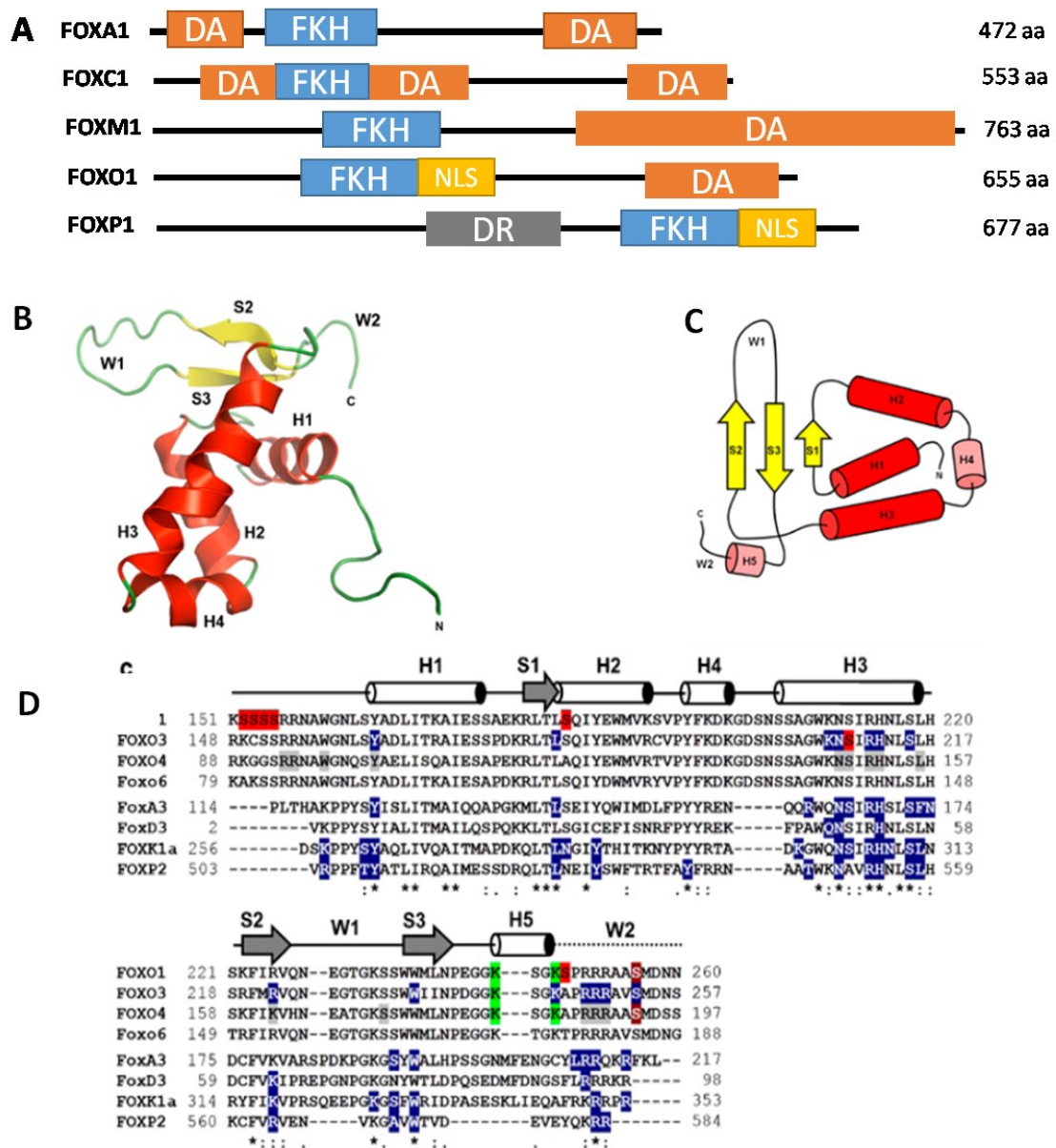


Figure 7 : Organisation des domaines et conservation du domaine forkhead dans plusieurs exemples de facteurs FOX.

A. Représentation schématique de l'organisation des principaux domaines de cinq protéines FOX. Tous les facteurs FOX possèdent un domaine forkhead (FKH) mais sa place dans la protéine est variable. Les protéines possèdent également un domaine d'activation (DA) ou de répression (DR) de la transcription et une ou plusieurs séquences NLS permettant l'adressage de la protéine au noyau.

B. Représentation Ribbon de la structure du domaine forkhead de FOXO4 (adapté de Weigt et al. 2001).

C. Topologie des domaines forkhead. Les hélices H4 et H5 sont propres à certaines protéines forkhead.

D. Alignement des séquences protéiques de huit domaines forkhead sur la structure secondaire des domaines FKH. En bleu et en gris, les résidus impliqués dans l'interaction entre la protéine et l'ADN. En marron, les résidus phosphorylés par Akt et en rouge les sites phosphorylables indépendants d'Akt. En vert, les sites acétylés. * indique que le résidu est conservé, : indique que c'est la substitution qui est conservée et . indique une semi-conservation de l'aa ancestral et de la substitution.

2. Reconnaissance de l'ADN et mécanismes d'actions

a) Reconnaissance et fixation à l'ADN

L'interaction du domaine *FKH* avec l'ADN se fait, à la fois, entre la troisième hélice α et le grand sillon de l'ADN et la deuxième boucle et le petit sillon de l'ADN (Figure 7B et C) (57, 64). La caractérisation physico-chimique de l'interaction entre FOXA1 et ses séquences cibles a montré que les ailes modulent l'affinité et la spécificité de la liaison (65). Le domaine *FKH* est la portion de la protéine la plus conservée au sein des membres de la famille des FOX, le reste des protéines ne s'alignant que très peu (Figure 7D). Il existe, cependant, des disparités dans la conservation de certaines régions. Par exemple, le domaine *FKH* des facteurs FOXP diffère de celui des autres facteurs FOX : la première aile est tronquée et la deuxième aile forme plutôt une hélice qu'une boucle. De plus le domaine *FKH* est localisé vers la partie C-terminale contrairement à ce qu'on observe pour les autres facteurs (Figure 7A).

Les facteurs FOX se lient généralement à l'ADN au niveau de sites asymétriques de 15 à 17 pdb (60). Plusieurs études *in vitro* ont permis l'identification d'une séquence minimale consensuelle de 7 pdb nécessaire pour la liaison de ces facteurs à l'ADN : 5'-(G/A)(T/C)(A/C)AA(C/T)A-3' (60). Cette séquence consensus est nécessaire, mais non suffisante, pour la fixation à l'ADN et elle admet un certain degré de dégénérescence d'après les sites identifiés *in vivo*. Les bases flanquantes de cette séquence centrale sont essentielles pour définir la spécificité d'interaction entre le FT et la séquence d'ADN (60, 66).

b) Dimérisation et interaction avec des protéines partenaires

Pendant longtemps les facteurs à domaine *FKH* ont été décrits comme se fixant à l'ADN sous forme de monomère alors que les autres FT possédant une structure « hélice-boucle-hélice » étaient décrits comme agissant en dimère (61). En 2006, l'obtention des structures cristallines de FOXP2 et FOXK1 montrent que ces facteurs se lient à l'ADN sous forme de dimère *via* une interaction par un domaine leucine-zipper. Les facteurs FOXP peuvent ainsi former un homodimère en partageant leurs hélices H3 et leurs feuillets S2 et S3 (67).

Si l'homodimérisation est rarement observée, les facteurs FOX n'agissent cependant pas seuls dans la régulation de la transcription de leurs gènes cibles. Ils peuvent ainsi interagir avec d'autres

facteurs, dont ceux de la famille des *FOX* : la régulation de p21-Cip1 (inhibiteur de la prolifération cellulaire) est réalisée par une coopération entre FoxO et FoxG1 passant par la création d'un complexe résultant de l'interaction de Foxo avec Smad3 et Smad4, reconnu ensuite par Foxg1 (68). Cependant les facteurs *FOX* sont connus pour avoir un grand nombre de partenaires autres que des *FOX*. Les facteurs FOXO interagissent notamment avec des FT comme SMAD3 (effecteur de la voie TGF- β), STAT3 (effecteur de la voie JAK/STAT), HOXA5, le récepteur aux œstrogènes (ER) ou encore l'Acide Rétinoïque (AR) (69–71). Ces interactions avec des protéines partenaires peuvent se faire *via* le domaine *FKH* (68, 71) mais également avec les autres domaines (72).

J'aimerais également souligner que plusieurs facteurs *FOX* sont décrits comme interagissant avec le récepteur aux œstrogènes α (Er α ou ESR1) afin de réguler plusieurs aspects cellulaires associés à la tumorigénèse. Dans la lignée cellulaire MCF7 (cancer du sein), FOXA1 agit comme facteur pionnier pour permettre la fixation d'ESR1 (73). De plus, les facteurs FOXO agissent en tant que suppresseur de tumeurs, ESR1-dépendant, dans le cancer du sein. En effet, dans les cancers ESR1-positif, l'expression de FOXO3 est associée à une diminution de l'invasion alors que dans les cancers ESR1-négatifs, l'expression de FOXO3 est associée à des tumeurs invasives (74).

La coopération des facteurs FOX entre eux et avec d'autres partenaires ajoute un niveau de complexité dans la régulation de la transcription. Elle est sans doute à l'origine de la capacité qu'ont les facteurs de cette famille à réguler un nombre de processus cellulaires aussi variés alors qu'ils possèdent un domaine *FKH* conservé reconnaissant une séquence consensus très proche.

c) Implications dans les voies de signalisation et régulations par modifications post-traductionnelles

Les FT *FOX* agissent en lien avec de multiples voies de signalisation. Les voies de signalisations suivent en général un même schéma assez classique où des signaux extracellulaires activent ou inactivent des enzymes capables de modifier post-traductionnellement ses substrats. Ces modifications entraînent un changement conformationnel de la protéine affectant sa fonction, sa stabilité, sa localisation cellulaire, sa capacité à interagir avec ses partenaires ou, dans le cadre des FT, sa spécificité de liaison à l'ADN. La modification la plus courante est la phosphorylation mais l'ubiquitination, l'acétylation, la méthylation ou la SUMOylation jouent aussi des rôles importants dans les voies de signalisation. Pour de nombreux facteurs *FOX*, des modifications post-

traductionnelles (PTM) ont été décrites et les techniques de spectrométrie de masse permettent d'en identifier de plus en plus.

Les facteurs *FOXOs* font partie de ceux où ce type de modifications est le plus étudié et le mieux connu. Cette famille consiste en quatre protéines, FoxO1, FoxO3, FoxO4 et FoxO6 chez les mammifères. Ces quatre paralogues de FoxO sont exprimées ubiquitairement avec quelques variations propres à chacune, par exemple FOXO1, FOXO3 et FOXO4 sont exprimées dans tout le cerveau alors que l'expression de FOXO6 est limitée à la région de l'hippocampe. Les facteurs FOXO jouent des rôles variés dans l'organisme incluant la régulation du métabolisme, la résistance au stress oxydatif et l'arrêt du cycle cellulaire. La phosphorylation, induite par une grande variété de protéines kinases, est la PTM la plus importante des protéines *FOXOs*. Les diverses enzymes assurant ces PTM sur les résidus de la protéine sont récapitulés dans la Table 2.

Table 2 : Table résumant les différentes modifications post-traductionnelles subies par les facteurs FOXOs, avec les enzymes, les sites concernés et l'effet sur l'activité de la protéine FOXO (issu de Wang et al., 2016)

NM : non mentionné et ND : non déterminé

Modification	Enzyme	Protéine concernées	Sites	Effet sur l'activité de FOXO
Phosphorylation	AKT	FOXO1	T24,S256,S319	↓
		FOXO3	T32,S253,S315	↓
		FOXO4	T28,S319,S258	↓
	SGK1	FOXO3	T32,S253,S315	↓
		PERK	FOXO1	S298,S301,S303
	MST1	FOXO1	S212	↑
		FOXO3	S207	↑
		FOXO4	S196	↑
		JNK	FOXO4	T447,T451
	ERK/p38	FOXO1	S246,S284,S295,S326,S413,S415,S429,S46,T475,T557	↑
		FOXO3	S294,S344,S425,	↓
	CDK1	FOXO1	S249	↑
	CDK2/5	FOXO1	S249	↓
AMPK	FOXO3	T179,S399,S413,S555,S588,S626	↑	
	FOXO1	T649	↑	
IkK	FOXO3	S644	↓	
Acétylation	CBP/p300	FOXO3	K242,K259,K262,K271	↓
			K290,K569	

		FOXO1	K242,K245,K262	↓
		FOXO4	K186,K189,K408	↑
Déacétylation	HDAC1/2	FOXO1/3	NM	↑
	HDAC4/5	FOXO1/3	NM	↑
	SIRT1	FOXO1/3/4	NM	↑↓
	SIRT2	FOXO1/3	NM	↑
	SIRT3	FOXO3	NM	↑
	SIRT6	FOXO3	NM	↓
Polyubiquitination	SKP2, COP1, CHIP	FOXO1	ND	↓
	MDM2	FOXO3	ND	↓
Monoubiquitination	MDM2	FOXO4	ND	↑
	USP7	FOXO4	ND	↓
Arginine méthylation	PRMT1	FOXO1	R248,R250	↑
Lysine méthylation	SET9	FOXO3	K270,K271	↓
Glycosylation	ND	FOXO1	ND	↑
	ND	FOXO3	ND	↑
	ND	FOXO4	ND	

Parmi les nombreuses voies de signalisation impliquant et régulant les facteurs *FOX*, la voie PI3K-AKT-mTOR joue un rôle majeur. Il s'agit d'une voie complexe impliquée dans la croissance, la prolifération et la survie cellulaire, dont l'activation peut se faire soit au niveau extracellulaire *via* des récepteurs à activité tyrosine kinase, soit au niveau intracellulaire par mutation ou surexpression de protéines impliquées dans cette voie. AKT (également appelée protéine kinase B) est la principale cible en aval de la voie de la phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K), et est la sérine/thréonine kinase la plus étudiée impliquée dans la phosphorylation des protéines *FOXO*. AKT phosphoryle FOXO1 sur trois sites, la phosphorylation en Ser256 changeant la charge positive du domaine de liaison de l'ADN en charge négative, réduisant ainsi son activité (75, 76). Le processus de phosphorylation de FOXO3 est régulé par AKT et la serum/glucocorticoid regulated kinase (SGK) de manière synergique (77).

La phosphorylation des protéines *FOXO* est nécessaire pour leur liaison à 14-3-3, qui est une protéine clé impliquée dans la translocation des protéines *FOXO* du noyau vers le cytoplasme. L'interaction entre *FOXO* et 14-3-3 modifie considérablement la structure du signal NLS, augmentant l'exportation nucléaire des protéines *FOXO* et diminuant leur ré-entrée dans le noyau (78, 79). Ce changement de localisation du facteur dans la cellule est associé à une réduction de son activité transcriptionnelle (Figure 8A). D'un autre côté, la dissociation du complexe FOXO3/14-3-3 est médiée par la protéine phosphatase 2, qui déphosphoryle FOXO3 au niveau de la Thr32 et de la Ser253 (79). Des études ont montré que la phosphorylation de la Thr24 de FOXO1 par AKT est nécessaire et suffisante pour sa liaison à 14-3-3, cependant le processus de translocation des protéines *FOXO* n'est pas seulement dépendant de 14-3-3. FOXO1 peut notamment être exclu du noyau suite à un signal induit par le facteur de croissance analogue à l'insuline 1 (IGF-1) sans que la formation du complexe avec 14-3-3 ne soit observée (80).

La modification de la distribution cellulaire des protéines FOXOs n'est pas la seule façon de moduler leur activité transcriptionnelle. Par exemple, l'activité transcriptionnelle de FOXO1 peut être inhibée par l'activation des voies de signalisation AKT induite par l'insuline. Cependant, lorsque le site clé (Leu375) du NLS, qui régule le transfert de FOXO1 vers le cytoplasme, est muté en alanine, FOXO1 perd sa capacité de relocalisation, mais, reste inhibé par l'insuline *via* un autre mécanisme (81). Un autre exemple est la phosphorylation de FOXO4 au niveau de Thr28 et Ser193 qui régule à la baisse l'activité de transcription de la protéine en supprimant la liaison à l'ADN (79). Enfin, AKT induit également la dégradation de FOXO par la voie protéasomique (82). La ligase E3, protéine 2 associée à la kinase en phase S (Skp2), supprime la transactivation de FOXO1 et élimine son effet sur l'inhibition de la prolifération cellulaire *via* la phosphorylation de la Ser256, provoquant la dégradation de FOXO1 par voie protéasomique (83).

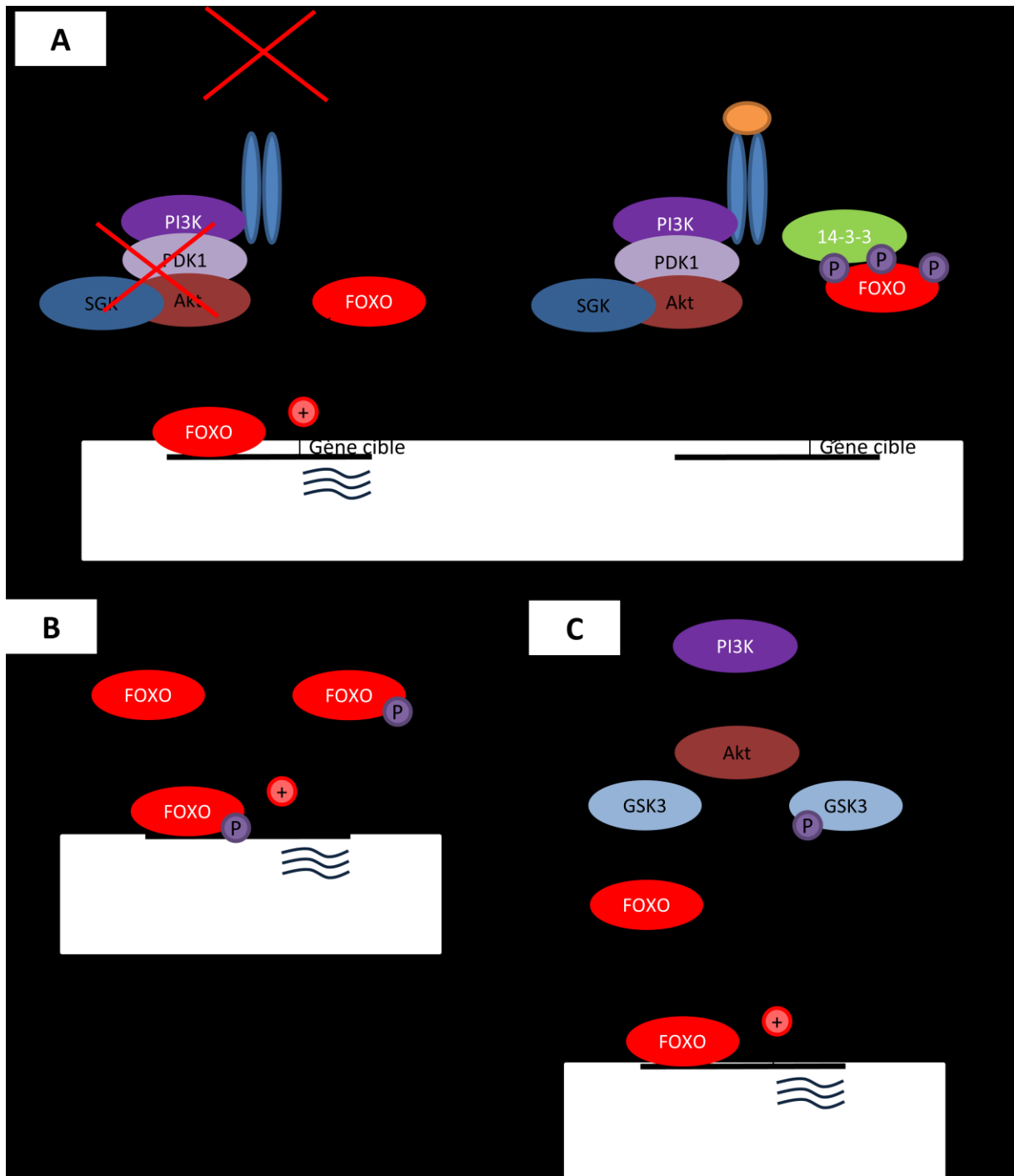


Figure 8 : Schémas récapitulant la régulation de protéines FOXOs via Akt et la signalisation de l'insuline.

A. Translocation des protéines FOXO et perte de l'activité facteur de transcription *via* l'interaction entre 14-3-3 et FOXO.

B. PERK phosphoryle FOXO au niveau de la Ser298 et augmente ainsi son activité transcriptionnelle.

C. Akt phosphoryle GSK3 au niveau de la Ser9 le rendant inactif alors que la liaison de GSK3 à FOXO l'active.

AKT réalise sa fonction de phosphorylation pour réguler les protéines FOXO par l'interaction avec divers facteurs qui forment une boucle de régulation complexe (84). La kinase ERK de type PKR (PERK) phosphoryle FOXO1 au niveau de Ser298, Ser301 et Ser303, mais préfère le site Ser298, qui n'est pas une cible d'AKT. PERK phosphoryle FOXO1 et augmente son activité transcriptionnelle, antagonisant l'effet de AKT (Figure 8B). PERK peut aussi directement réguler à la hausse ou à la baisse l'activité des protéines FOXOs *via* des effets indirects sur AKT. En effet, PERK augmente l'expression du récepteur à l'insuline, ce qui augmente l'activité d'AKT, inhibant l'activité de FOXO (Figure 8A)(85).

AKT phosphoryle aussi d'autres protéines qui ensuite peuvent jouer un rôle sur les facteurs FOX, notamment GSK3 β phosphorylé à la Ser9 le rendant inactif (Figure 8C) (86) alors que GSK3 β régule positivement l'activité de FOXO1 en se liant directement à ce dernier (87). La signalisation de l'insuline et de l'IGF peut aussi induire une phosphorylation de GSK3 β et FOXO médiée par AKT, entraînant l'inactivation de GSK3 β puis de FOXO.

d) Fonctions des gènes FOX

Malgré de grandes similarités dans leurs domaines *FKH* et donc dans la reconnaissance d'une séquence consensus d'ADN, les facteurs FOX ont des rôles bien distincts. En 2007, Tuteja et Kaestner ont publié un état des lieux des gènes FOX humain, incluant une table de potentiels partenaires, des rôles des facteurs au niveau cellulaire et au niveau du développement, les mutants connus et les rôles dans les maladies humaines, complétée en 2016 (88–90).

Bien que les facteurs FOX aient des profils d'expression différents, des profils de phosphorylation et autres PTM variées et soient décrits comme ayant des rôles propres dans les processus biologiques, certains d'entre eux partagent des rôles similaires. Les facteurs FOX ont un rôle très important lors du développement et la délétion d'un de ces facteurs chez la souris est très souvent délétère suggérant qu'il n'existe pas de compensation au sein de la famille. Cependant, leurs sites consensus très proches les uns des autres laissent penser qu'ils peuvent se substituer les uns aux autres dans une certaine mesure. Il est probable que certains des rôles similaires dans des tissus différents reflètent des différences dans les modèles d'expression, de sorte qu'une protéine FOX pourrait jouer un rôle dans le foie qu'une autre assurerait dans les tissus neuraux. Il est aussi probable que des protéines FOX distinctes agissent de manière divergente sur les mêmes loci, par exemple en recrutant des cofacteurs différents.

i. Facteurs pionniers

Les facteurs *FOX* jouent un rôle central dans la transcription. J'ai détaillé précédemment les aspects de la régulation transcriptionnelle et notamment la conformation de la chromatine et l'accès aux séquences régulatrices. Il existe ainsi des facteurs, dit pionniers, qui peuvent ouvrir la chromatine compactée sans faire intervenir les facteurs de remodelage de la chromatine (65).

Parmi les facteurs *FOX*, les protéines *FOXA* ont été décrites majoritairement comme étant des facteurs pionniers. Cette famille consiste en trois protéines, *FOXA1*, *FOXA2* et *FOXA3*. Ils participent à l'ouverture de la chromatine *via* l'interaction entre leur domaine C-terminal et les histones H3 et H4. Ce remodelage chromatinien aide ces facteurs à réguler le développement d'un grand nombre d'organes, dont le foie, le pancréas, les poumons, la prostate et les reins (91). La fonction pionnière de *FOXA* permet aussi de faciliter la liaison des récepteurs nucléaires d'hormones, notamment le récepteur des glucocorticoïdes et le récepteur des œstrogènes. Il a été proposé que la fonction pionnière de *FOXA1* s'exerce *via* son mode de reconnaissance de l'ADN, de la même façon que les histones de liaison. Partant de ce postulat, l'ensemble des facteurs à domaine *FKH* pourrait agir en tant que facteurs pionniers dans des types cellulaires/conditions variés. *FOXO* et *FOXE* présentent d'ailleurs aussi, comme les facteurs *FOXA*, la capacité d'agir en tant que facteurs pionniers (92, 93).

ii. Développement et organogénèse

Les facteurs *FOX* jouent un rôle majeur dans le développement et la mise en place des organes. L'étude de modèles murins KO ou KI a permis de mettre en évidence, leurs rôles prépondérants, des exemples de ces modèles et l'implication dans l'organogénèse seront détaillés ci-après.

Les trois facteurs *FOXA* jouent un rôle dans le développement. En revanche, l'expression plus précoce de *Foxa2* par rapport à *Foxa1* et *Foxa3* se reflète dans la gravité des phénotypes chez les souris dépourvues de ces facteurs. Les souris *Foxa2*^{-/-} meurent entre E10 et E11, présentant des défauts dans les trois feuillets embryonnaires (94, 95). Les hétérozygotes *Foxa2*^{+/-} sont viables mais présentent un phénotype de type Parkinson après vieillissement (96). Contrairement aux souris *Foxa2*^{-/-}, celles qui sont dépourvues de *Foxa1* survivent jusqu'après la naissance mais présentent des défauts dans la morphogénèse de la prostate (97). Au vu du profil d'expression limité de *Foxa3*, les souris déficientes en *Foxa3* présentent le phénotype le plus léger et sont viables avec une durée de vie normale (98).

Comme la létalité embryonnaire des souris *Foxa2*^{-/-} empêche l'analyse du rôle de FOXA2 dans l'organogenèse et la fonction de nombreux tissus, des souris présentant des délétions conditionnelles de *Foxa2* ont été étudiées. Les études de ces mutants révèlent que FOXA2 participe à la morphogenèse des poumons (99). De plus, de graves défauts dans la formation des îlots pancréatiques et la maturation des cellules alpha et bêta sont observés entraînant des altérations de l'homéostasie du glucose (100)(détaillés ci-après).

Le rôle crucial de FOXM1 dans le développement est souligné par des études qui en perturbent l'expression. Les souris présentant des délétions conditionnelles de *Foxm1* présentent de profonds défauts de prolifération dans des tissus tels que le foie, le cœur, le pancréas, l'intestin, les poumons et les muscles lisses. En outre, le KO précoce de *Foxm1* dans le cœur (101) ou le foie (102) entraîne une létalité embryonnaire, tandis que les souris dépourvues de *Foxm1* dans les cellules musculaires lisses (103) ou dans l'épithélium pulmonaire (104) meurent en période périnatale.

Comme pour les FOXA, les souris KD pour *Foxp* présentent des phénotypes variés. Les souris *Foxp1*^{-/-}(105) et *Foxp4*^{-/-}(106) présentent une létalité embryonnaire à E14,5 due à un amincissement du myocarde ventriculaire cardiaque. Les souris *Foxp2*^{-/-} présentent de graves défauts cérébelleux et des troubles moteurs et meurent généralement avant l'âge de 3 semaines (107). Les KD de facteurs FoxP spécifiques aux tissus entraînent également des troubles dans leurs mises en place et leurs développements. Les souris présentant une délétion de *Foxp1* dans les neurones sont viables mais présentent un changement morphologique dans le striatum et l'hippocampe (108).

Enfin, les souris *Foxj1*^{-/-} meurent aussi majoritairement au cours du développement embryonnaire ou dans les quelques jours qui suivent leur naissance. Les animaux survivants se distinguent facilement de leurs compagnons de portée par leur taille plus petite et leur faible prise de poids postnatale. Ces animaux présentent à la fois de graves anomalies internes, avec inversion des organes abdominaux, et une absence totale d'épithéliums ciliés (109).

iii. Cycle cellulaire et prolifération

La prolifération cellulaire est l'un des facteurs critiques qui régulent le développement. Par conséquent, une régulation spatio-temporelle adéquate de la prolifération cellulaire est nécessaire pour une morphogenèse appropriée, ainsi que pour la détermination de la taille et des fonctions des organes. Un certain nombre de facteurs FOX a été impliqués dans la régulation de la prolifération

cellulaire. FoxM1 et FoxO, par exemple, sont connus depuis longtemps pour avoir des rôles opposés dans le cycle cellulaire. FOXM1 est largement reconnue pour son rôle dans la modulation du cycle cellulaire. Ses cibles transcriptionnelles directes agissent à la fois aux transitions G1/S et G2/M, ainsi que pendant la caryokinèse et la cytokinèse (110). En conséquence, l'expression de *Foxm1* est principalement confinée aux cellules qui se répliquent activement ; son expression est donc large dans les embryons et diminue dans les tissus différenciés (111) en cohérence avec son rôle dans le développement et la mise en place des organes.

De nombreux autres facteurs FOX, tels que FoxC2, FoxE3, FoxF1, FoxF2, FoxN1 et FoxN3, régulent également la prolifération (88, 89).

iv. Identité cellulaire

Les facteurs FOXA contribuent également à préserver l'identité des cellules en servant de "marque-places" ou de "signets" aux gènes impliqués notamment dans le cycle cellulaire ou nécessaire au fonctionnement sain de la cellule pendant la division cellulaire ; une fois la cytokinèse terminée, ces gènes spécifiques précédemment marqués par FoxA peuvent être facilement réactivés *via* son activité de facteur pionnier (112).

Foxp3 est lui spécifiquement exprimé dans les cellules T régulatrices (T reg) et joue un rôle clé dans leur différenciation et leur fonction (113). Au cours de la différenciation des cellules T reg, l'expression de *Foxp3* est induite en réponse à la signalisation de TCR et de l'IL-2 (113), et son expression est nécessaire à la fonction des cellules T reg (114). En plus de conférer une identité cellulaire et une compétence fonctionnelle pendant la différenciation des cellules T reg, *Foxp3* joue un rôle essentiel dans leur maintien car le KD conditionnel d'un seul allèle de *Foxp3* dans des cellules T reg différenciées entraîne une perte de leur fonction (115).

Enfin, ici, on parlera aussi brièvement de FOXL2 (qui sera détaillé plus tard), qui est un régulateur transcriptionnel clé de la différenciation et du maintien des cellules de la granulosa, cellules participant à la maturation et la croissance des ovocytes pendant la folliculogenèse (116–118). En effet, les cellules de la granulosa matures sont absentes chez les souris *Foxl2*^{-/-}, résultant d'un blocage des cellules de la pré-granulosa qui ne se différencient plus (116). De plus, le KD de *Foxl2* dans les cellules de la granulosa déjà matures chez les souris entraîne leur transdifférenciation moléculaire et la régulation à la hausse des marqueurs des cellules de Sertoli, l'équivalent mâle des cellules de la granulosa (117).

v. Vieillessement

Enfin, pour clôturer cette partie sur la mise en place d'un organisme et son maintien, je développerai rapidement le rôle des facteurs *FOX* dans le vieillissement.

L'expression de *FoxM1* diminue avec l'âge dans de nombreux tissus, et cette diminution s'accompagne d'une baisse à la fois de la prolifération de base et du potentiel de réplication. Néanmoins, la réactivation de l'activité de *Foxm1* dans les hépatocytes et les cellules bêta pancréatiques vieillissantes a permis à ces cellules de récupérer une activité répliative (119). De plus, les hépatocytes transplantés exprimant *FOXM1b* ont réussi à repeupler les foies des receveurs aussi bien que les hépatocytes de jeunes souris (120).

Récemment, les FT FoxO ont été signalés comme régulant la durée de vie chez les rongeurs (121, 122). Chez la souris, *Foxo3* semble nécessaire pour une durée de vie prolongée en raison de son rôle dans le métabolisme (122). À l'heure actuelle, les mécanismes par lesquels FOXO3 ou d'autres FT FOXO influencent la durée de vie chez l'être humain, si tant est qu'ils l'influencent, sont encore inconnus. Cependant, on pourrait imaginer que les multiples processus dans lesquels les FOXO jouent un rôle, tels que la résistance au stress, la régulation du cycle cellulaire et le contrôle de l'apoptose, pourraient tous influencer le vieillissement en bonne santé.

v. Migration cellulaire

Une fois mis en place, les tissus évoluent et peuvent notamment subir des dommages. Les mécanismes précis qui contrôlent le processus de réparation des tissus restent mal compris. Toutefois il apparaît que la prolifération y jouerait un rôle majeur ainsi que la migration des cellules.

Le rôle des FOXO dans le contrôle de la migration et de l'invasion des cellules a été étudié dans différents modèles cellulaires. Le rôle dans l'invasion sera détaillé dans la partie D, plus axée autour des processus associés aux cancers. Pour la migration cellulaire, je détaillerai ici l'exemple des FOXO dans la réparation des plaies cutanées. En cas de lésion, FOXO1 et FOXO4 sont retrouvés fixés à proximité des promoteurs de gènes différentiellement exprimés dans l'épiderme, et les métalloprotéases de la matrice (MMPs) sont fortement régulées à la hausse dans les plaies cutanées (123). Les kératinocytes produisent plusieurs MMPs nécessaires à la migration, notamment les MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 et MMP-10, jouant un rôle essentiel dans la ré-épithélialisation (124). Ces

protéases perturbent les attaches des hémidesmosomes pour faciliter la libération des kératinocytes de la membrane basale et permettre la migration de ces cellules dans la plaie. FOXO1 coordonne la réponse des kératinocytes à la cicatrisation de la plaie en activant ses cibles, *integrin- α 3*, *integrin- β 6*, *MMP-3* et *MMP-9*, nécessaires à la migration des kératinocytes (125).

Iv. Immunité

Le rôle des facteurs *FOX* dans l'immunité est principalement associé aux facteurs *FOXP*. Les souris *Foxp3*^{-/-} présentent un défaut de régulation des lymphocytes T et une augmentation du taux de prolifération des lymphocytes, entraînant une attaque immunitaire contre plusieurs cellules et organes. L'attaque des cellules bêta du pancréas, provoque une maladie ressemblant au diabète de type 1 et les souris *Foxp3*^{-/-} meurent avant l'âge de 4 semaines (126). L'expression de *FOXP3* est également requise pour l'homéostasie immune et la reconnaissance du soi (127).

Le facteur *FOXN1* joue aussi un rôle prépondérant. En effet, le phénotype "nude" est dû à une mutation récessive du gène *Foxn1*, qui provoque l'absence de poils et, surtout, une absence de thymus congénitale chez les souris, les rats et les humains (128). Une délétion dans le gène *Foxn1* des souris « nudes » est associée à un changement du cadre de lecture, ce qui entraîne la perte du domaine de liaison à l'ADN de ce FT. L'absence de thymus résultant d'une perte de fonction de *Foxn1* est caractérisée par l'absence de tous les principaux types de cellules épithéliales thymiques (CET), indiquant que *Foxn1* régule la croissance et la différenciation de toutes les CET de manière autonome au niveau cellulaire.

Enfin, les *FOXO* sont aussi impliqués dans l'immunité. Bien que les souris *Foxo3a*^{-/-} soient initialement en bonne santé à la naissance, après 8 mois, elles développent une maladie lymphoproliférative avec infiltrations de plusieurs organes, entraînant une inflammation multisystémique. De plus, Lin *et al.* ont signalé que l'activité de *FOXO3A* était fortement réduite dans les cellules T de souches de souris avec lupus érythémateux diffus (même phénotype pour la délétion de *Foxj1*) par rapport aux animaux non auto-immuns (129). Ces données indiquent que, *in vivo*, *FOXO3A* et *FOXJ1* peuvent réguler l'homéostasie des lymphocytes.

vi. Métabolisme

Comme je l'ai déjà mentionné dans le paragraphe « vieillissement », les FT FOXO sont principalement décrits dans la fonction de médiation de l'insuline et de la signalisation de type insuline (130). Ils sont notamment décrits pour leurs implications dans le diabète et la régulation du métabolisme. En effet à jeun, FOXO active la transcription des gènes impliqués dans la réponse à l'insuline, incluant les gènes codant les enzymes responsables de la gluconéogénèse (glucose-6-phosphatase et phosphoenolpyruvate carboxykinase) dans le foie. Au contraire, en présence de nutriments, l'insuline active la voie PI3K. Brièvement, la liaison de l'insuline au récepteur de l'insuline provoque la phosphorylation du substrat 1/2 du récepteur de l'insuline (IRS1/2), entraînant une cascade de signalisation (PI3K/AKT), et conduit finalement à la phosphorylation de FOXO puis à sa translocation dans le cytoplasme. De plus, les protéines FOXO phosphorylées par AKT sont stabilisées dans le cytoplasme par des interactions avec les protéines d'échafaudage 14-3-3 (131). De ce fait, l'expression des gènes répondant à l'insuline est éteinte.

Les facteurs FOXA jouent également un rôle de régulation de l'homéostasie du glucose et du métabolisme. Les souris dépourvues de *Foxa1* survivent jusqu'après la naissance mais présentent une létalité entre le jour postnatal 2 et 12 en raison d'une hypoglycémie et de défauts de la fonction rénale (132). Les souris déficientes pour *Foxa3* sont viables avec une durée de vie normale, mais présentent toutefois une hypoglycémie après un jeûne prolongé en raison de défauts dans la production hépatique de glucose (98). Il est intéressant de noter que les souris exprimant une forme activée de FOXA2 dans les neurones présentent un phénotype orexigène (c'est-à-dire un appétit stimulé) (133). Bien que les effets non ciblés de cette protéine mutée ne puissent être exclus, cette étude implique *Foxa2* dans d'autres aspects encore de la régulation métabolique, à savoir l'apport alimentaire et la production d'énergie.

Plus récemment, FOXM1, FOXP1, FOXP2 et FOXP4 ont été décrits comme jouant un rôle dans ces mêmes processus (90).

Comme nous venons de le voir, les FT *FOX* sont des régulateurs de l'expression des gènes remarquablement bien conservés chez les mammifères et contribuent au contrôle de tous les aspects du développement, d'avant la gastrulation jusqu'à la prévention des maladies de l'adulte. Pour ces raisons, les FT *FOX* constituent une cible médicamenteuse prometteuse compte tenu de leur implication dans un grand nombre de processus. Cependant, comme ce sont des FT et qu'ils ne sont donc pas accessibles à la surface des cellules, ni même généralement dans le cytoplasme, ils sont restés jusqu'à présent largement inaltérables, que ce soit au niveau de l'expression ou de l'activité. Les futures études visant à cibler le FT *FOX* devraient être orientées dans les directions suivantes : la délivrance spécifique au type de cellule d'une charge utile de médicament qui serait internalisée, la compréhension puis le ciblage des mécanismes de régulation de l'expression des *FOX* et l'identification et le ciblage des gènes cibles des *FOX*.

L'étude de modèles murins a révélé que les facteurs *FOX* participaient à un équilibre biologique complexe. Une perte ou un gain de fonction va donc provoquer l'apparition d'un phénotype pathologique dans la majorité des cas. Dans la prochaine partie je développerai la place qu'occupent les facteurs *FOX* dans les cancers.

C. Cancer et régulation de la transcription par les forkheads

Les facteurs *FOX* sont décrits comme jouant un rôle critique dans un grand nombre de processus biologiques. En 2000, Hanahan et Weinberg publient les six capacités distinctives biologiques des cancers incluant l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, la capacité d'échapper à l'apoptose, la capacité de se répliquer indéfiniment, l'induction de l'angiogenèse et la capacité à former des métastases (134). En 2011, ils ajoutent la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire et la capacité d'échapper au système immunitaire, ainsi que deux caractéristiques favorisant les cancers : l'inflammation favorisant les tumeurs et l'instabilité et les mutations du génome (Figure 9)(135).

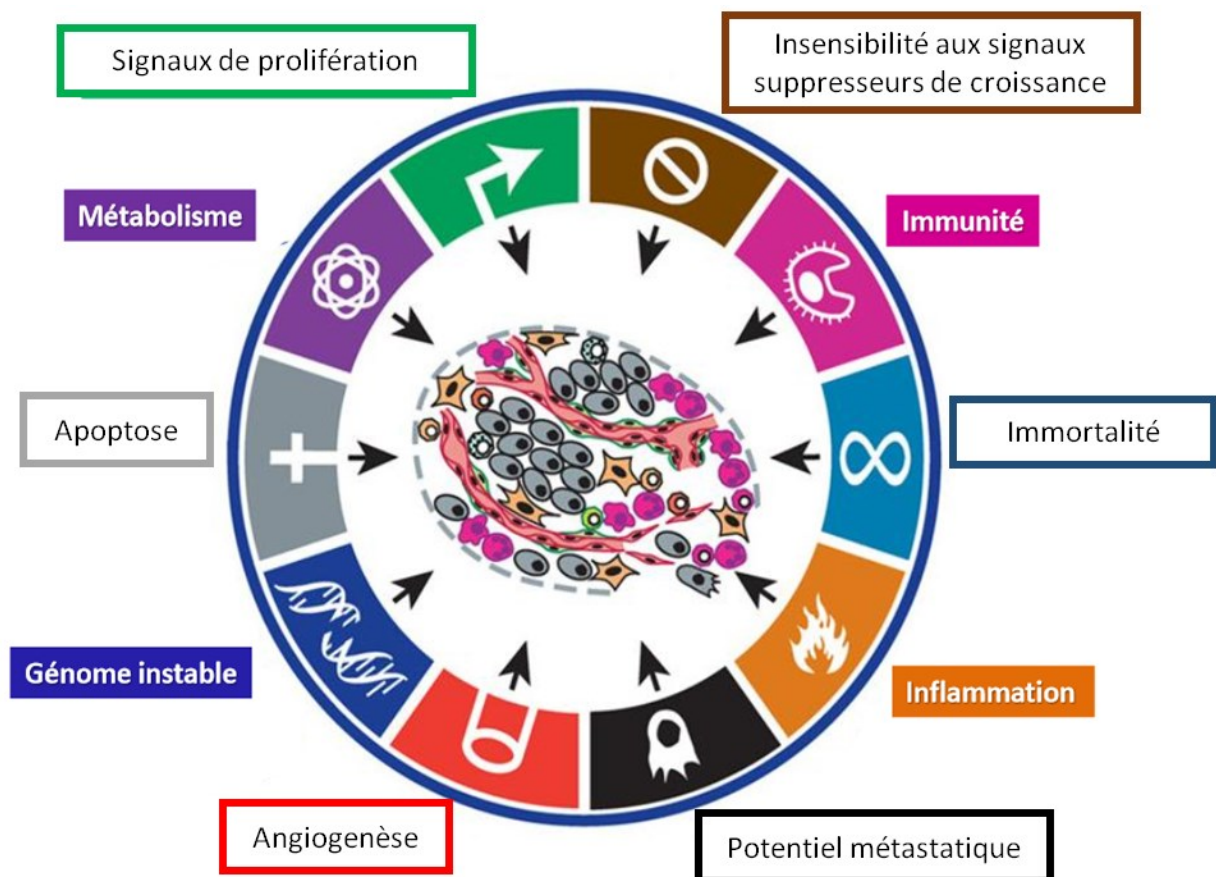


Figure 9: **Représentation schématique des biomarqueurs du cancer (d'après Hanahan and Weinberg, 2011.)**

En « plein » les biomarqueurs décrits en 2000 et en « encadré » les biomarqueurs ajoutés en 2011.

On l'a vu, les facteurs *FOX* jouent un rôle prépondérant dans le développement et la morphogénèse des organes. A l'âge adulte, ils continuent à être exprimés et sont impliqués dans la différenciation et la prolifération. En considérant l'importance de nombreux facteurs *FOX* dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la différenciation, mais aussi le métabolisme et l'immunité, leurs implications dans la régulation de la tumorigénèse sont devenues incontournables. Il apparait donc cohérent qu'une dérégulation ou des mutations de ces FT soient associés à une activation de la tumorigénèse. La Figure 10 récapitule les différents rôles des FT FOX en miroir des biomarqueurs du cancer présentés par Hanahan et Weinberg en 2010 puis en 2011. Je vais maintenant détailler les rôles joués par les protéines FOXA, FOXO et FOXM, les principaux facteurs impliqués dans le cancer.

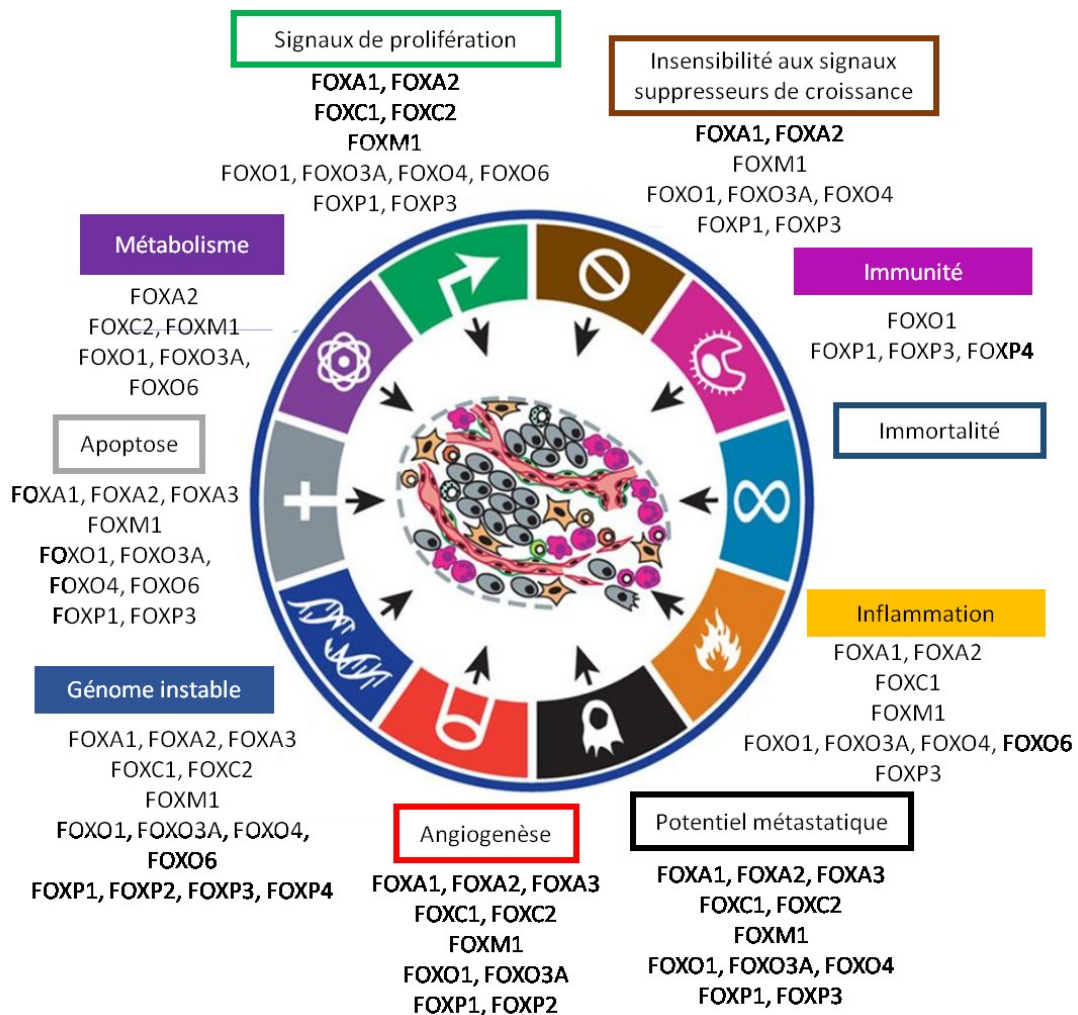


Figure 10 : Associations directes et indirectes de quatorze protéines FOX avec les biomarqueurs du cancer.

FOXO1 peut être associé à chaque marque. FOXM1, FOXO3a, FOXA2 et FOXP3 sont liés à au moins huit marques de cancer.

1. Forkhead Box A (FOXA)

a) Des facteurs pionniers associés à une dualité cancer-spécifique

En tant que facteurs pionniers, FOXA1, FOXA2 et FOXA3 aident, *via* l'accès à la chromatine, les autres FT à agir de façon tissu-spécifique (91). Leurs dérégulations ou mutations entraînent donc un chamboulement au niveau génomique, rendant accessibles (ou inaccessibles) certaines régions du génome. De ce fait FOXA1 et FOXA2 jouent un rôle important dans la tumorigenèse en termes d'activation de l'invasion, de la formation de métastases et de l'activation de signaux de prolifération. Ils sont, d'ailleurs, impliqués dans un large panel de cancers et leur comportement est « tumeur-spécifique », dû à cette dépendance vis-à-vis des autres FT dont ils régulent l'action (136). Dans les cancers du poumon, de l'œsophage et de la prostate, la sur-activation de FOXA1 est associée à une malignité plus importante (97, 137). Au contraire dans le cancer de la vessie, c'est une baisse de l'expression de FOXA1 qui est associée aux tumeurs infiltrantes, où on observe un franchissement de la lame basale de l'épithélium et une invasion dans le muscle de la vessie (138). Un second exemple de cette dualité est l'association de FOXA1 avec les formes de cancers du sein dépendantes du récepteur aux œstrogènes et les formes de cancers de la prostate dépendantes du récepteur aux androgènes. Dans le premier cas, la sur-régulation de FOXA1 est associée à un bon pronostic pour les patientes alors qu'elle est associée à un mauvais pronostic pour les patients atteints du cancer de la prostate (139).

Récemment, une étude sur la répression des facteurs FOXA par SNAL1 dans les cancers colorectaux a montré la fonction pionnière des facteurs FOXA dans les régions enhancers de gènes épithéliaux. Une absence de FOXA et l'expression d'une forme dominante négative de FOXA2 sont associées à une condensation des enhancers au niveau des gènes *CDH1*, *CDX2* et *EPHB3*. De plus, la mutagenèse dirigée et l'édition du génome *in situ* des sites de liaison de FOXA dans les constructions de gènes rapporteurs montrent une altération de l'activité enhancer supprimant l'état de chromatine active de l'activateur *EPHB3*. Inversement, l'expression des facteurs FOXA dans les cellules dont les enhancers de *CDX2* et *EPHB3* sont inactifs a conduit à l'ouverture de la chromatine et au dépôt *de novo* des marques H3K4me1 et H3K27ac (140).

b) Une instabilité de la prolifération cellulaire : FOXA-médiateur-cohésine dépendante

Des analyses de CHIP-seq ont montré que FOXA1 et FOXA2 recrutent des coactivateurs et interagissent avec d'autres FT au niveau des activateurs fonctionnels. En 2016, grâce à l'intégration de plusieurs données de CHIP-Seq accessibles au public, Fournier et *al.* proposent une prédiction du circuit de régulation transcriptionnelle de base de chaque cellule cancéreuse. De manière inattendue, pour toutes les cellules étudiées, les FT pionniers FOXA1 et/ou FOXA2 ont été identifiés en plus des FT spécifiques aux cellules. La perte de ces deux types de FT phénocopie ainsi la perte du médiateur et de la cohésine. Ils montrent que les FT spécifiques et pionniers sont essentiels pour recruter le médiateur et la cohésine dans les régions régulatrices des gènes activement transcrits. Ils proposent alors que le maintien de l'état des cellules cancéreuses dépend du recrutement du médiateur et de la cohésine par le biais de FOXA et des FT spécifiques (141).

c) Un rôle putatif dans la régulation métabolique

D'un autre côté, les facteurs FOXA jouent un rôle prépondérant dans le métabolisme des lipides et des carbohydrates et la phosphorylation de FOXA2 est associée à un meilleur contrôle du diabète de type 2 (142). Ces observations laissent à penser que les facteurs FOXA pourraient jouer un rôle dans la dérégulation du métabolisme associée aux cancers.

2. Forkhead Box O (FOXO)

Comme décrit précédemment, les protéines FOXO régulent négativement une multitude de processus biologiques. De ce fait, ils sont associés à tous les biomarqueurs associés au cancer (Figure 10).

a) Suppresseur de tumeurs ou facteurs pro-tumoraux

Les facteurs FOXO sont souvent considérés comme des suppresseurs de tumeurs en lien avec les fonctions qu'ils régulent, tels l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. De plus, FOXO1, FOXO3 et FOXO4 sont présents aux points de cassures chromosomiques impliqués dans des rhabdomyosarcomes (pour FOXO1) et des leucémies aiguës myéloïdes (pour FOXO3 et FOXO4). Enfin PTEN, un suppresseur de tumeur connu, est un activateur des facteurs FOXO (143).

Comme je l'ai mentionné plus haut, les facteurs FOXO sont des cibles de la voie PI3K-AKT et l'activation de cette voie est associée à une inactivation des facteurs FOXO (144). Cette voie est souvent constitutivement active dans les cancers, en association avec des mutations gain de fonction dans les gènes codant trois tyrosine kinases, RAS, PI3K ou PTEN (résumé dans 119). Il est donc attendu que les facteurs FOXO soient à l'état phosphorylé cytosolique dans ces cancers, associé à une survie et une prolifération accrues des cellules. Plusieurs exemples coïncident avec ce postulat comme les lymphomes où une transformation des lymphocytes pré-B par l'oncogène ABL1 (Abelson murine Leukemia viral oncogene homolog 1) est associée à une suppression de l'apoptose induite par FOXO3, suite à l'activation de la voie PI3K-AKT (146). De même, l'expression de FLT3-ITD (FMS-like tyrosine kinase 3), un récepteur mutant qui est trouvé couramment dans la leucémie myéloïde aiguë (LMA), conduit à l'activation de la voie PI3K-AKT avec phosphorylation et inactivation de FOXO3 dans les cellules transfectées. FLT3-ITD réprime alors l'expression de p27KIP1 (CDKN1B) et de Bim (BCL2L11) normalement induites par FOXO3 et entraîne un maintien de la prolifération et la survie des cellules (147).

En parallèle, d'autres voies de régulation existent. Ainsi, ERK phosphoryle également FOXO3 sur trois résidus sérine (S294, S344 et S425), distincts des substrats d'AKT, ce qui permet son interaction avec la ligase E3-ubiquitine MDM2 (148). FOXO3 est alors polyubiquitinée par MDM2 et ensuite dégradée par les protéasomes. Dans les tissus cancéreux du sein humain, une corrélation inverse entre l'expression de MDM2 et de FOXO3 a été observée et un grade tumoral plus élevé a été associé aux tissus cancéreux MDM2-positifs et FOXO3-négatifs, soulignant la pertinence pathologique de cette relation. De plus, dans le glioblastome, AKT et ERK contrôlent ensemble l'activité de FOXO3 (149). Enfin FOXO3 est également une cible directe de IKK α et β (voie IKK-NF- κ B), qui phosphorylent le résidu S644 et induisent son exclusion nucléaire et sa dégradation par les protéasomes (150). Dans la LMA, FOXO3 est souvent localisée dans le cytoplasme à la suite de sa phosphorylation par IKK constitutivement actif, plutôt que par AKT. Ce faisant, IKK stimule la survie et la prolifération des cellules et favorise la tumorigenèse (151). IKK ϵ , un autre membre de la famille des IKK, est également capable de phosphoryler FOXO3 sur le résidu S644, bloquant ainsi l'apoptose. D'ailleurs, dans le cancer du poumon humain, la phosphorylation de FOXO3 sur le résidu S644 est corrélée à l'expression de IKK ϵ (152). Ces données suggèrent que la régulation de FOXO3 par différents membres de la famille IKK pourrait être un mécanisme clé de la tumorigenèse.

Enfin, plusieurs micro-ARN (miRs), dont les miR-96, miR-182 et miR-183, ont été identifiés comme régulateurs de l'expression de FOXO dans différents types de cancer. Il a été rapporté que le miR-96 surexprimé favorisait la prolifération des cellules tumorales en ciblant FOXO3 dans le cancer du sein et FOXO1 dans le carcinome des cellules transitoires (un type de cancer de la vessie) (153, 154). Dans les cellules de mélanome, le miR-182 est régulé à la hausse et cible FOXO3 et MITF (Microphthalmia-associated transcription factor), ce qui augmente leur caractère invasif (155). De plus, dans la lignée cellulaire de cancer du sein MCF7, le miR-27a agit avec le miR-96 et le miR-182 pour cibler FOXO1 et favoriser la croissance des cellules tumorales (156). Dans le lymphome de Hodgkin classique, FOXO1 est fréquemment régulé à la baisse, en partie grâce à l'action combinée des miR-96, miR-182 et miR-183 (157). Des rôles similaires sont observés dans les cancers de l'endomètre, les ostéosarcomes, le cancer de la prostate et le carcinome hépatocellulaire (158, 159).

Comme mentionné plus haut, il a été initialement démontré que la phosphorylation de FOXO dans les cellules leucémiques favorisait leur prolifération et leur survie. Cependant, conformément au rôle essentiel des FOXO dans les cellules souches hématopoïétiques, plusieurs études ont mis en évidence un rôle positif des FOXO dans le maintien des cellules initiatrices de leucémie (CIL), qui se caractérisent par leur capacité à s'auto-renouveler, à réinitialiser la leucémie et à résister à la thérapie. Dans la leucémie myélogène chronique (LMC), la kinase de fusion oncogène BCR-ABL active de manière constitutive la voie PI3K-AKT, qui phosphoryle FOXO dans les cellules leucémiques. En bloquant BCR-ABL, les inhibiteurs de la tyrosine kinase (TKI) tels que l'imatinib induisent un arrêt de la croissance cellulaire et l'apoptose, au moins en partie en réactivant les FOXO (160). Cette thérapie induit une rémission à long terme dans la LMC mais n'élimine pas efficacement les CIL, qui entraînent une récurrence de la LMC. Naka et ses collègues ont montré que, malgré l'activation de BCR-ABL, FOXO3 reste actif dans le noyau des CIL et joue un rôle essentiel dans le maintien de la leucémie (161). Paradoxalement, la délétion de FOXO3 induit l'apoptose des CIL. L'activation de FOXO3 dans ces cellules a été attribuée à l'inhibition d'AKT par la signalisation TGF β . En conséquence, la déplétion de FOXO3 ou l'inhibition du récepteur TGF β augmente l'efficacité de l'imatinib dans un modèle murin. Une étude a identifié BCL-6 comme un gène cible de FOXO qui réprime p53, améliore l'auto-renouvellement des CILs et joue un rôle important dans leur survie (162). Ces observations montrent l'existence d'une voie TGF β -FOXO3-BCL6 qui favorise la persistance de la leucémie et explique le rôle ambivalent de FOXO3.

Un rôle similaire des FOXO a été décrit dans la leucémie myéloïde aiguë (LMA). Dans un modèle murin de LMA induite par le gène de fusion MLL-AF9, les CIL présentent une faible

phosphorylation d'AKT et donc FOXO y est actif. Dans ces cellules, le KD de FOXO ou l'activation induite d'AKT induisent la maturation des cellules leucémiques et augmentent la mort cellulaire. Cela a également été observé dans des lignées cellulaires humaines de LMA. Lors de l'analyse du transcriptome d'une large cohorte de LMA, un sous-groupe de patients présentant une signature génomique cible spécifique de FOXO a été identifié, indiquant que les FOXO peuvent jouer un rôle dans une proportion significative des cas de LMA (163).

En conclusion, alors que les délétions de *Foxo1*, 3 et 4 chez la souris induisent un trouble myéloprolifératif, les FOXO jouent également un rôle essentiel dans l'auto-renouvellement des cellules initiatrices de la leucémie. Suite à ces études, une question clé est de savoir si les FOXO peuvent jouer des rôles similaires dans d'autres types de cellules initiatrices de cancer. Des résultats opposés ont été signalés dans le glioblastome, le cancer du côlon et le cancer du sein. En effet, il a été démontré que FOXO3 induit la différenciation des cellules souches de glioblastome lors d'un traitement avec une combinaison d'inhibiteurs ciblant PI3K, mTOR et MEK (149). Au contraire dans les cellules souches du cancer du sein ou du colon, l'activation de FOXO3 par les inhibiteurs de PI3K ou AKT1 entraîne l'apoptose et la perte du phénotype des cellules souches (164).

b) Contrôle de l'invasion et métastase

Le rôle des FOXO dans le contrôle de la migration et de l'invasion des cellules a été étudié dans différents modèles cellulaires. Dans le cancer de la prostate, AEG1 (gène 1 suractivé par les astrocytes, métadhérine ou MTDH) est souvent surexprimé et joue un rôle dans l'invasion cellulaire. Le knock-down d'*AEG1* réduit la viabilité et l'invasion des cellules et augmente l'expression de FOXO3 et sa localisation nucléaire. L'effet pro-invasif d'*AEG1* pourrait être partiellement causé par la répression de FOXO3 (165). L'expression de FOXO3 est également diminuée dans les cancers urothéliaux invasifs et est corrélée à la survie des patients. Dans les cellules cancéreuses urothéliales, le KD de FOXO3 augmente l'expression de Twist1 et ainsi la motilité cellulaire (166). Dans le cancer de la prostate, la down-régulation de FOXO4 par la voie PI3K-AKT est corrélée avec l'apparition de métastases. FOXO4 limite la migration et l'invasion des cellules du cancer de la prostate *in vitro*, au moins en partie en antagonisant le rôle FT RUNX2 (167). De même, il a été démontré que FOXO1 régule négativement l'activité transcriptionnelle de RUNX2 (Runt-related transcription factor 2) ainsi que la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de la prostate médiée par RUNX2 (168).

Comme mentionné ci-dessus, plusieurs études ont démontré que FOXO3 actif induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses du côlon (164). Cependant, l'activation concomitante de β -caténine et de FOXO3 a montré que cette activation prévenait la mort cellulaire et induisait des métastases des xénogreffes chez les souris (169). Dans le carcinome du côlon humain, les niveaux nucléaires élevés de FOXO3 et de β -caténine sont d'ailleurs en corrélation avec le stade métastatique et une survie plus courte. En présence de β -caténine, FOXO3 agit donc comme un inducteur de métastases plutôt que comme un suppresseur de tumeur. Ce comportement pourrait potentiellement expliquer d'autres activités pro-tumorales de FOXO (170).

Les FOXO ont également été impliqués dans la promotion de l'invasion des cellules tumorales du sein. Dans les cellules de cancer du sein, le rôle de FOXO3 dans la migration et l'invasion des cellules a été lié au statut du récepteur d'œstrogène α (ER α). En effet, dans les cellules ER α +, FOXO3 coopère avec l'œstradiol 17 β pour réduire l'invasion cellulaire, tandis que dans les cellules ER α -, FOXO3 tend à l'augmenter (74). Au cours de la progression du cancer, la masse tumorale augmente provoquant une privation de sérum, ce qui entraîne l'importation de FOXO dans le noyau et son activation *via* PI3K-AKT. Dans ce contexte, FOXO3 induit l'expression des métalloprotéases matricielles 9 et 13 (MMP-9 et MMP-13) favorisant la migration et l'invasion cellulaire (171). De même, dans les cellules de cancer du sein humain, FOXO1 induit la transcription de MMP-1, augmentant le potentiel invasif cellulaire. Cette régulation implique la phosphatase CDC25A et CDK2 (172).

c) Sénescence

La sénescence induite par un oncogène protège les organismes contre la formation de tumeurs en limitant le développement de lésions bénignes. Voulant clarifier les mécanismes impliqués dans ce processus, Courtois-Cox *et al.* ont montré que l'activation aberrante de Ras déclenche la sénescence par une boucle de rétroaction négative qui supprime la signalisation Ras et PI3K, conduisant à l'activation de FOXO1 et 3. L'expression d'un mutant FOXO actif suffit alors pour induire la sénescence de fibroblastes humains (173).

L'oncogène BRAFV600E peut également favoriser la sénescence par une autre voie de signalisation, la voie MEK-ROS-JNK. En effet, la signalisation de BRAFV600E par la voie MEK induit une augmentation des niveaux de ROS (pour *Reactive Oxygen Species*) et une activation de JNK. FOXO4 est ensuite activée par phosphorylation *via* JNK, ce qui entraîne l'expression de CDKN1A/p21 et la

sénescence induite par FOXO4 (174). Ces études ont élargi le rôle des FOXO en tant que suppresseurs de tumeurs capables de favoriser la sénescence en réponse à un oncogène.

d) Angiogenèse

L'angiogenèse est un processus physiologique par lequel de nouveaux capillaires se développent à partir de vaisseaux sanguins préexistants et est nécessaire à la croissance de la tumeur. Ce mécanisme implique la stimulation des cellules endothéliales par des facteurs angiogéniques (par exemple, VEGF) pour favoriser leur prolifération, leur migration et la formation de vaisseaux (175). Bien que les FOXO aient été impliqués dans ce processus en tant que facteurs pro- et anti-angiogéniques, leur rôle dans l'angiogenèse tumorale n'est pas encore clairement défini.

La principale preuve de la fonction pro-angiogénique des FOXO1 provient d'études sur le développement embryonnaire. En effet, les souris *Foxo1*^{-/-} meurent à E11.5 en raison d'un développement vasculaire gravement altéré des embryons et des sacs vitellins (176). Conformément à ces données, dans les cellules endothéliales adultes, certains gènes pro-angiogéniques régulés par VEGF, tels que la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1 (VCAM-1), sont exprimés *via* FOXO (177). En accord avec ces effets, le rôle des FOXO a été étudié dans l'angiogenèse de tumeurs gastriques. L'analyse de 272 échantillons de tissus de patients atteints d'un cancer gastrique a montré que FOXO1 est constitutivement phosphorylée et inactivée dans 85 % des cellules tumorales. La phosphorylation de FOXO1 est corrélée avec une expression plus élevée des régulateurs angiogéniques VEGF et HIF-1 α et avec des surfaces de microvaisseaux plus importantes. Cela suggère que l'inactivation de FOXO1 dans les tumeurs gastriques fait partie d'un mécanisme qui favorise l'angiogenèse (178).

e) Réponse au stress oxydatif

Les facteurs FOXO sont impliqués dans la réponse au stress oxydatif en favorisant la détoxification cellulaire par l'induction de la superoxyde dismutase (SOD2) et l'expression de la catalase. En protégeant les cellules d'une accumulation excessive de ROS, les FOXO peuvent prévenir le développement du cancer. Ceci est illustré par une étude sur les cellules souches hématopoïétiques, dans lesquelles les FOXO sont essentielles pour maintenir l'homéostasie des ROS. Chez les souris *Foxo3*^{-/-}, l'accumulation de ROS conduit à un syndrome myéloprolifératif. Ce syndrome est médié par la signalisation des cytokines renforcée par les ROS (179).

Plusieurs résultats ont établi un lien entre les FOXO et l'autophagie. En particulier, il a été démontré que FOXO1 favorise l'autophagie en réponse au stress oxydatif, ce qui pourrait contribuer à son activité de suppresseur de tumeurs (180).

2. Forkhead Box M (FOXM)

Le gène *FOXM1* est fréquemment surexprimé dans les cancers humains (181). Bien que FOXM1 puisse stimuler la régulation du cycle cellulaire en phase S de réplication de l'ADN (G1/S), il joue également un rôle important dans la transition G2/M par transactivation des modulateurs de la mitose et de la cytokinèse (182). Le FT oncogène FOXM1 est activé dans diverses tumeurs malignes humaines et est nécessaire à l'exécution du programme mitotique et contribue à l'instabilité chromosomique (CIN pour Chromosomal INstability) (183). De plus, FOXM1, en combinaison avec la dérégulation de la croissance des cellules précancéreuses, permet aux kératinocytes humains de proliférer malgré l'accumulation de dommages à l'ADN, stimulant ensuite l'instabilité génomique (184).

Cependant, des modèles de souris suggèrent que la surexpression de *Foxm1* en soi n'est pas un événement déclencheur de la cancérogenèse. Les souris qui expriment de manière constitutive *FOXM1B* humain dans tous les tissus ne développent pas spontanément de tumeurs au moins jusqu'à l'âge de 12 mois (185). Cependant, la sur-expression de *FOXM1B*, en plus d'initier des mutations, est associée à des tumeurs plus grandes, plus vascularisées et plus métastatiques (185). Inversement, les souris KO ou KD tissu-spécifique pour *Foxm1* présentent une charge tumorale réduite par rapport aux témoins lorsqu'elles sont traitées avec des substances cancérogènes (185).

Les FT, et parmi eux les facteurs *FOX*, jouent un rôle central dans la régulation de la transcription spécifique à chaque type cellulaire. Ainsi dans chaque cellule et tissu l'identification des FT et la compréhension de leur rôle, seul ou avec leurs partenaires, permettent de comprendre comment cette régulation se passe puis d'aller plus loin et comprendre la pathologie, notamment les mécanismes induisant la tumorigénèse. Dans l'équipe nous travaillons sur l'ovaire qui est un organe complexe composé de cellules très différentes qui interagissent entre elles et se développent ensemble *via* une coopération. Dans cet organe de nombreux facteurs, dont des FT à domaine *FKH*, sont décrits comme jouant un rôle dans la différenciation puis le maintien des types cellulaires mais

leurs actions restent mal définies. De plus, dans l'ovaire plusieurs pathologies sont décrites et notamment plusieurs types de cancers, sans traitement spécifique. Il constitue donc un organe intéressant à étudier d'un point de vue régulation de la transcription.

2. Le facteur de transcription FOXL2 dans la fonction ovarienne normale et pathologique

Chez les mammifères femelles, l'ovaire est un organe complexe qui assure plusieurs fonctions essentielles à la reproduction, telles que la production de gamètes et la production hormonale d'œstrogènes et de progestérone, nécessaire à sa fonction endocrine. Il est, de ce fait, au centre de la mise en place et du développement des organes reproducteurs et des caractères sexuels secondaires. L'ovaire, siège de la folliculogenèse, est un organe dynamique composé de plusieurs types cellulaires, présentés ci-après, qui doivent se différencier mais aussi être maintenu dans le temps.

Des analyses de liaison génétique ou des études d'association à l'échelle du génome ainsi que des modèles de souris génétiquement modifiées ont permis de découvrir des nouveaux gènes candidats pour les troubles de la fertilité et ont conduit à une meilleure compréhension de la fonction de reproduction féminine (186). En plus des hormones et de leurs récepteurs ainsi que des molécules de signalisation, les FT jouent un rôle important dans la fonction ovarienne. Il est ensuite devenu évident que la perte des facteurs *FOX* était préjudiciable à la fertilité féminine, ce qui fait l'objet de cette partie. Au préalable, je vais décrire le développement de l'ovaire et présenter les cellules de la granulosa, qui sont les cellules sur lesquelles nous travaillons dans l'équipe.

A. L'ovaire un organe complexe et dynamique

1. De la gonade indifférenciée à la mise en place de l'ovaire

a) Phase initiale de développement ou stade indifférencié

Chez les mammifères, la mise en place des gonades débute par la formation de la crête génitale (ou gonade bi-potentielle) qui se développe à partir du système uro-génital. La crête génitale contient les futures cellules somatiques de la gonade (187) : les futures cellules de la granulosa ou de Sertoli. Plusieurs facteurs sont nécessaires à la formation des gonades chez la souris, comme les FT WT1, LHX9, CBX2 et NR5A1, spécifiquement exprimés dans la crête génitale (188, 189). En effet, chez l'être humain, des mutations de ces FT sont associées à un phénotype de réversion sexuelle (individus XY avec phénotype féminin pour les gonades).

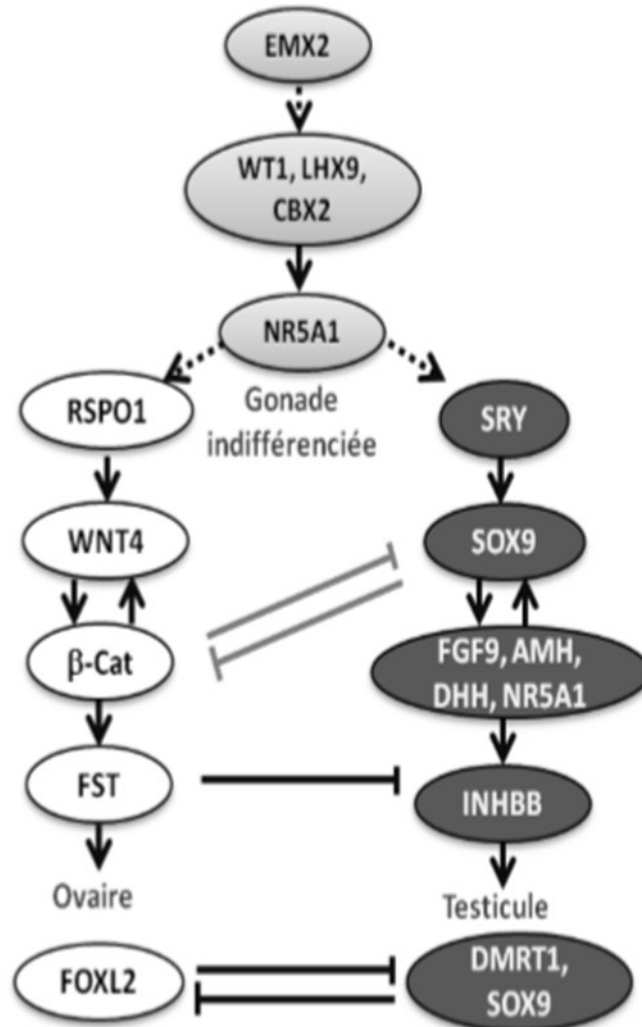


Figure 11 : Représentation schématique des principaux gènes impliqués dans la différenciation sexuelle (adaptée de Edson et Nagaraja).

Les gènes impliqués dans la différenciation femelle (panel de gauche) et mâle (panel de droite) constituent deux réseaux de régulation mutuellement exclusifs.

Ce phénotype est soit associé à un rôle dans la formation des gonades soit à un rôle dans la régulation de l'expression de NR5A1 (190), nécessaire à l'expression des gènes essentiels dans la mise en place du sexe masculin. D'ailleurs son expression est maintenue dans le développement du testicule alors que son niveau reste faible dans l'ovaire.

b) Déterminisme du sexe et différenciation ovarienne

Le dimorphisme sexuel est le résultat d'activation de réseaux de régulations différents et incompatibles qui jouent un rôle propre au sexe de l'individu. Le sexe génétique (XX ou XY) détermine alors le sexe gonadique. Chez l'individu XY, le FT SRY (Sex determining region of the Y), est exprimé sous l'influence notamment de SF1, WT1. SRY et NR5A1 initient alors ensemble le programme de différenciation mâle, *via* une activation de SOX9, régulant lui-même plusieurs gènes essentiels au développement des testicules et des caractères secondaires mâles, tels l'*AMH*, *FGF9* ou *DHH* (191–193). Chez la souris, SOX9 seul est nécessaire et suffisant à la détermination sexuelle mâle, SRY participant, tout de même, à son activation temporelle précise (192). Chez l'individu XX, c'est la simple absence de SRY qui entraîne le développement d'un ovaire (Figure 11).

Les principaux gènes nécessaires à la formation de la gonade femelle font partie de la voie β -caténine (WNT4, RSPO1 et la β -caténine elle-même). Cette voie active l'expression de la follistatine (FST), un inhibiteur de la voie TGF- β , nécessaire à la formation de l'ovaire. En effet, dans les souris femelles, l'inactivation du gène *Fst* est associée à un développement de structures typiques du testicule dans les gonades (194). D'autres facteurs comme *Bmp2* et *Foxl2* qui sont exprimés au début du développement de l'ovaire pourraient jouer un rôle. FOXL2 est le marqueur de l'ovaire dont l'expression spécifique est la plus précoce connue à ce jour, dès 12,5 jpc. Cependant, les souris *Foxl2*^{-/-} présentent un développement normal jusqu'à la naissance (116, 195). Il est intéressant d'ajouter que l'inactivation de la β -caténine dans des cellules NR5A1-positives est associée à une perte d'expression de *Foxl2* et *Wnt4*, signifiant donc un arrêt de la voie de différenciation femelle.

En plus de promouvoir l'expression de gènes spécifiques à chaque sexe, les voies β -caténine et SOX9 se répriment mutuellement, rendant les deux réseaux de régulation incompatibles (Figure 11) (187, 196).

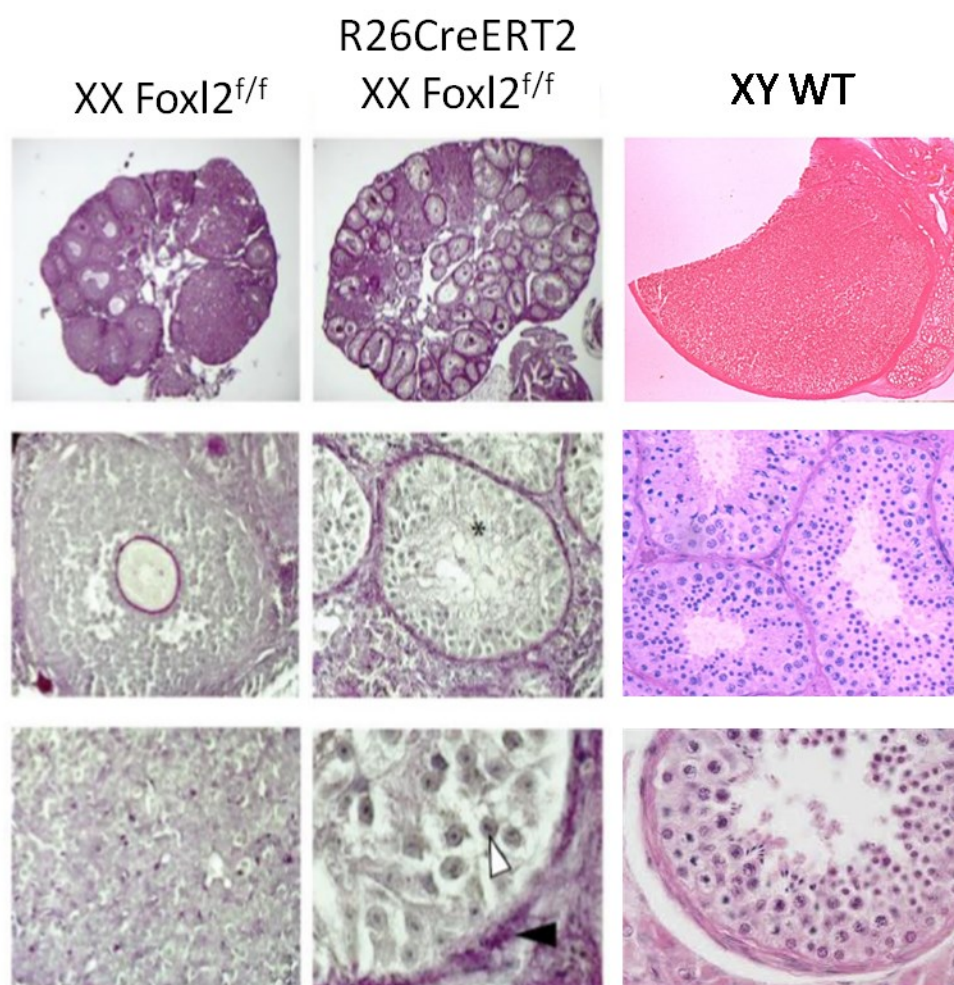


Figure 12 : Phénotype gonadique de l'inactivation de Foxl2 induite à l'âge adulte chez la souris (d'après Ulhenhaut et al., 2009) en vis-à-vis des structures testiculaires.

Panel de gauche, coupe ovarienne puis grossissement sur un ovocyte issu de femelle X/X WT. Panel central, invalidation de Foxl2 à l'âge adulte conduit à une transdifférenciation de l'ovaire. La gonade invalidée contient des structures qui ressemblent à des tubes séminifères. Les cellules de la granulosa sont transdifférenciées en cellules de « type-Sertoli », avec prolongements cytoplasmiques (astérisque) et nucléole tripartite (flèche blanche). Les structures en tubes sont entourées d'une lame basale (flèche noire). En panel de droite, une coupe de testicule puis un grossissement sur les cellules de Sertoli.

c) Maintien de l'identité ovarienne

Une fois déterminés, les types cellulaires ne sont pas fixés et restent sous le contrôle de facteurs spécifiques, empêchant ainsi une transdifférentiation (Figure 11). Pour l'ovaire, et particulièrement dans les cellules de la granulosa, FOXL2 permet ce maintien de l'identité cellulaire. L'inactivation de *Foxl2* dans des cellules de la granulosa différenciées conduit d'ailleurs à une expression de marqueurs spécifiques des cellules de Sertoli et à l'apparition de structures ressemblant aux tubes séminifères du testicule dans l'ovaire (117) (Figure 12).

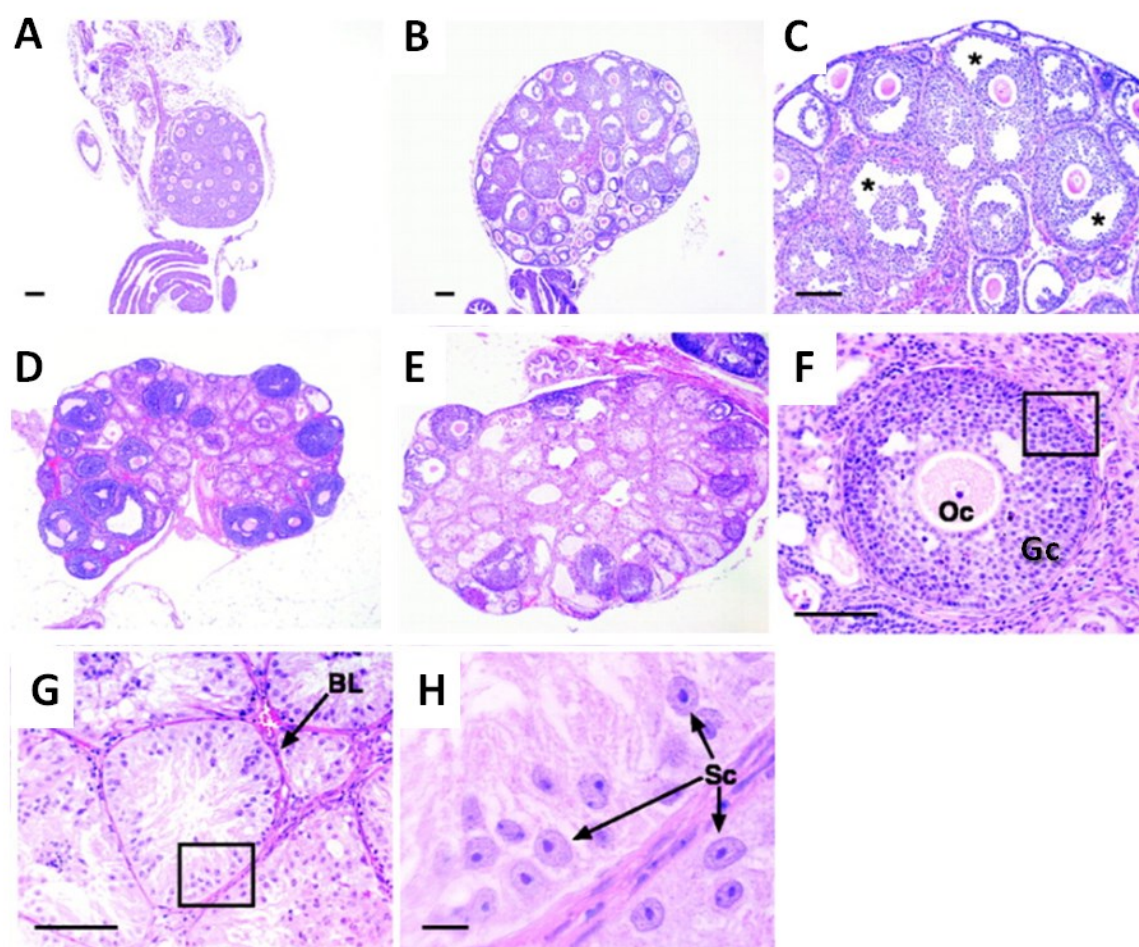


Figure 13 : **Phénotypes morphologiques des ovaires de souris sauvage ou double KO pour les deux récepteurs aux oestrogènes, *Esr1* et *Esr2* ($\alpha\beta$ ERKO) (adaptée de Couse et al., 1999).**

Les ovaires du contrôle pré-pubertaire [(A), grossissement, $\times 13.2$] et les femelles $\alpha\beta$ ERKO [(B), $\times 13.2$ et (C), $\times 33$] illustrent la maturation précoce de l'ovaire $\alpha\beta$ ERKO comme en témoignent les multiples gros follicules antraux [indiqués par des astérisques en (C)], qui ne sont pas observés dans le contrôle.

Un grossissement à faible puissance d'un ovaire adulte représentatif (2,5 à 7 mois) $\alpha\beta$ ERKO (D et E) illustre les diverses structures présentes, notamment les follicules relativement sains et en cours de maturation et les follicules « sertoli-like » qui occupent une grande partie de la gonade. Le grossissement d'un follicule sain dans un ovaire adulte $\alpha\beta$ ERKO [(F), $\times 66$] montre un seul ovocyte (Oc), plusieurs couches de cellules de granulosa (Gc), et une lamelle basale et un thécum intacts (Tc). Le grossissement d'une zone de follicule « sertoli-like » [(G), $\times 66$ et (H), $\times 330$] montre que l'ovocyte a dégénéré et que les cellules somatiques ont subi une transdifférenciation vers un phénotype de cellules de Sertoli (Sc). La préservation de la lame basale (BL) du follicule explique l'aspect tubulaire des cordes du testicule. Les cellules de type Sertoli possèdent un nucléole triparti caractéristique et des extensions cytoplasmiques en forme de voile (H) similaire au phénotype observé en KD *Foxl2*.
Barre d'échelle en (C) à (E), (G) et (J), 100 μm ; barre d'échelle en (H) et (K), 10 μm .

Le même phénotype est observé dans des souris KO pour les deux récepteurs aux œstrogènes, *Esr1* et *Esr2* (197, 198) (Figures 13). De la même façon chez la souris, la délétion de *Smad3* provoque un arrêt de croissance au stade du follicule préantral et une diminution de la prolifération et de la survie des cellules de la granulosa (199). Ces observations laissent envisager un contrôle complexe dans le maintien de cette identité cellulaire.

d) Assemblage des follicules

La formation des follicules primordiaux résulte d'un dialogue entre les cellules germinales et somatiques. En effet si la différenciation et la maintien des cellules de la granulosa ne perdurent pas les cellules germinales (CG) meurent (117). Et inversement, la perte de CG après la formation des follicules entraîne une transdifférenciation des cellules de la granulosa en cellules de « Sertoli-like » (194, 200). Enfin, chez le rat, l'entrée en méiose de l'ovocyte a été montré comme jouant un rôle prépondérant : si elle est retardée, il y a un décalage dans la formation des follicules et inversement, si elle est plus précoce, les follicules primordiaux se forment plus rapidement (201).

Chez la souris, les CG entrent en méiose et la prophase I se déroule entre 13,5 et 15,5 jpc. A la naissance, les ovocytes sont groupés en amas et à 3 jours plus tard plus de 80% des ovocytes sont déjà intégrés dans des follicules primordiaux (202). Les facteurs paracrines sécrétés par les ovocytes et les cellules de la granulosa en différenciation aident à l'assemblage des follicules. Les ovocytes activent la formation des follicules dès qu'ils arrivent au stade diplotène de première division de méiose. Cette étape est caractérisée par une baisse de l'expression de *Sycp1* juste avant l'assemblage des follicules primordiaux (201) et l'expression du FT Folliculogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix (FIGLA). D'ailleurs, chez la souris, lorsque ce FT est muté, aucun follicules ne se forment à la naissance (203). La formation du follicule implique également une activation de la voie de signalisation NOTCH (conservée chez tous les métazoaires). La perte de cette voie dans l'ovaire néonatal de souris entraîne une baisse importante du nombre de follicule primordiaux formés (204). L'activation de cette voie, témoignage d'un dialogue entre les cellules germinales et somatiques, résulte de la fixation d'un de ses ligands Jagged1 (*JAG1*), sécrété par les ovocytes, sur le récepteur Notch homolog 2 (*NOTCH2*), exprimé par les cellules de la granulosa. D'autres facteurs participent à l'assemblage folliculaire, comme la Connective tissue growth factor (*CTGF*) et l'Activine A (facteur de croissance de la famille du TGF- β). Alors que certains, tels que l'AMH, FGF2 et le facteur de nécrose tumorale alpha (*TNF α*) sont au contraire décrits comme inhibant cet assemblage (205).

Chez l'être humain, l'entrée en méiose de l'ovocyte et l'assemblage folliculaire se fait de manière asynchrone pendant toute la vie fœtale et on observe des follicules secondaires et pré-antraux à partir du 3ème trimestre de grossesse. A la naissance, la fillette naît avec un pool de follicules primordiaux fixé (environ 1-2 millions). L'expression de certains facteurs décrits chez la souris dans l'assemblage folliculaire est retrouvée chez la femme, comme FIGLA (206), cependant les mécanismes chez l'humain se distinguent, permettant probablement que divers stades de différenciation des CG coexistent dans l'ovaire fœtal.

L'assemblage des cellules folliculaires, cellules de la pré-granulosas, autour des ovocytes permet la formation des follicules primordiaux. Les mécanismes entrant jeu dans la mise en place des cellules de la granulosa doivent être étudiés car cela affecte la folliculogénèse, entraînant une réduction du pool de follicules primordiaux disponibles et donc une insuffisance ovarienne prématurée (IOP).

2. Folliculogenèse

La folliculogenèse regroupe les étapes de formation, croissance et maturation des follicules jusqu'à l'ovulation. La différenciation des follicules est un évènement tardif qui intervient au dernier tiers de la période de gestation chez la plupart des mammifères (ou après la naissance chez le lapin et les rongeurs). Les follicules sont constitués d'un ovocyte entouré d'une ou plusieurs couches de cellules somatiques folliculaires (suivant le stade de développement) : les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque. La folliculogenèse démarre par la fragmentation des nids ovigères et la formation des follicules primordiaux. Cette formation se fait grâce à un dialogue entre les cellules somatiques et les cellules germinales (détaillée ci-dessus), les cellules de la pré-granulosa s'intercallant entre les ovocytes pour former une couronne cellulaire autour d'eux. Les ovocytes restés seuls dégénèrent par apoptose.

Les follicules primordiaux formés pendant la vie fœtale représentent un ensemble défini d'ovocytes disponibles pour la vie reproductive. Le nombre de follicules primordiaux est d'environ 1-2 millions à la naissance mais une forte atresie folliculaire a lieu pendant l'enfance ne laissant que 400 000 follicules primordiaux disponibles au moment de la puberté. Sur ce pool, seulement quelques follicules primordiaux entreront en croissance et 400 à 500 ovocytes seulement seront ovulés et potentiellement fécondables. Ainsi, le stock de follicules décroît à chaque cycle jusqu'à ce que l'ovaire cesse de fonctionner, on parle alors de ménopause.

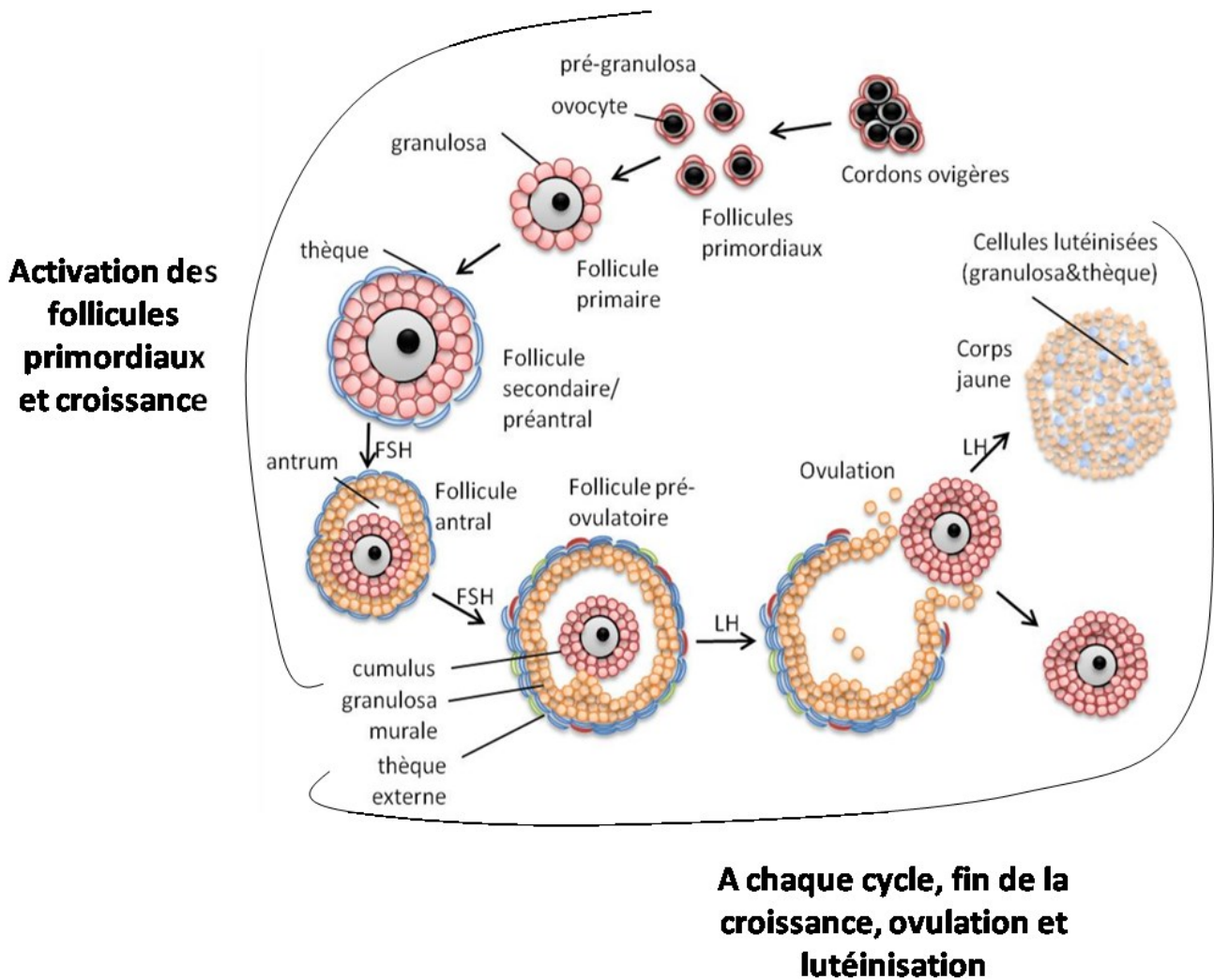


Figure 14 : Représentation schématique de la folliculogénèse (adaptée de George et al., 2014).

La FSH contrôle la croissance folliculaire aux stades pré-antral et antral puis la LH prend le relais lors de l'ovulation et de la lutéinisation. Les types cellulaires et structures de l'ovocyte sont indiqués directement sur le schéma.

a) La croissance des follicules

La croissance des follicules se déroule en deux phases distinctes (Figure 14). La première étape consiste en une croissance basale indépendante de tout signal hormonal (principalement les gonadotropines hypophysaires, LH et FSH). Les follicules primordiaux sont alors activés, ils sortent du pool de follicules primordiaux et entrent en croissance, atteignant le stade de follicules à antrum chez la femme (ou pré-antral chez la souris). Cette étape se déroule dans la vie foetale ou juste après la naissance pour les rongeurs. La seconde étape a lieu à la puberté et est activée à chaque cycle. Ainsi les follicules antraux sensibles aux gonadotrophines peuvent finir leur croissance mais un seul atteindra le stade de follicule ovulatoire. Les cellules de la granulosa se multiplient et produisent œstrogènes et inhibine sous l'effet de la FSH. En parallèle, les cellules de la thèque sensibles à la LH produisent des androgènes nécessaires à la production d'œstrogènes. Oestrogènes et inhibine bloquent la production de FSH par rétro-contrôle négatif au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire. La baisse de FSH permet une sélection des follicules sensible à la FSH même à basse concentration et seuls les follicules sensibles continuent leur croissance. Le follicule sélectionné va alors finir sa croissance jusqu'au stade pré-ovulatoire. A ce stade les cellules de la granulosa sensibles à la FSH augmentent leur production d'œstrogènes et d'Inhibine et un rétro-contrôle positif entraîne un pic de sécrétion de LH conduisant à l'ovulation (207).

b) Les cellules somatiques des follicules : origines et différenciation

i. Origine des cellules de la granulosa

Les cellules de la granulosa et les cellules de Sertoli ont un précurseur cellulaire commun, les cellules de l'épithélium cœlomique (208). L'étude des cellules somatiques des gonades d'embryons chimériques XX/XY a montré que certaines cellules de Sertoli pouvaient avoir un génotype XX et qu'à l'inverse des cellules de la granulosa pouvaient être XY, témoignant de cette origine commune (209, 210).

En 2012, l'équipe de Blanche Capel a montré que chez la souris, les cellules de la pré-granulosa sont générées, en deux vagues, à partir de l'épithélium cœlomique (211). Dans un premier temps, des cellules de la pré-granulosa se différencient entre 11,5 et 14,5 jpc à partir des précurseurs bipotentiels. Ces cellules de la granulosa constitueront les follicules présents à proximité de la medulla qui seront les premiers à croître. La seconde population de cellules de la pré-granulosa se

différencie plus tardivement. Ces cellules formeront alors les follicules localisés vers le cortex qui seront activés seulement à la puberté (211).

ii. Les cellules de la granulosa et la croissance folliculaire

On l'a vu la formation des follicules primordiaux est le résultat d'un dialogue entre les cellules somatiques et les cellules germinales.

Par la suite, lorsqu'un follicule est activé, les cellules de la granulosa (trois à cinq cellules parentales) entourant l'ovocyte subissent au moins 10 divisions clonales pour arriver à plus de 2000 cellules dans le follicule antral mature (212). A partir de là, les cellules de la granulosa ne reçoivent aucun apport sanguin direct mais elles reposent sur une lame basale qui les sépare des cellules de la thèque interne vascularisées.

L'hormone stéroïde clé produite par les cellules de la granulosa est l'œstradiol. La synthèse de cette hormone nécessite là encore une collaboration avec les cellules de la thèque (voir ci-après) qui entourent le follicule et qui produisent des androgènes (déhydroépiandrostérone (DHEA), androstènediol, androstènedione, testostérone) en réponse à la LH. Ces androgènes diffusent ensuite dans les cellules de la granulosa et sont converties en œstrogènes (œstrone et estradiol), par l'aromatase du cytochrome P450 (ou CYP19A1) dans les cellules de la granulosa, en réponse à la présence de FSH (voir ci-après).

iii. Les cellules de la granulosa et l'ovulation

La FSH induit l'expression des récepteurs de la LH dans les cellules de la granulosa du follicule préovulatoire. Le récepteur de la LH (LHCGR) est d'ailleurs exprimé majoritairement dans les cellules de la granulosa des ces follicules. En revanche, l'expression du récepteur à la FSH (FSHR) diminuent dans les cellules de la granulosa à mesure que le follicule grandit. Cela entraîne que dans les derniers stades de la maturation folliculaire, la LH prend le relais de la FSH en association avec une accélération de la maturation folliculaire (213).

Le follicule "choisi" pour ovuler synthétise lui de l'œstradiol en quantités importantes, entraînant sa détection dans la circulation systémique. Cette sécrétion ovarienne d'œstrogènes liée à l'émergence d'un follicule dominant est détectable aux alentours du 5^{ème} jour du cycle (214). Lors de la poussée ovulatoire de LH, les cellules de la granulosa se différencient en cellules lutéiniques de la granulosa, population de cellules lutéales majeures du corps jaune. Elles sécrètent alors de la

progestérone. Ce phénomène est en fait le résultat d'une régulation à la hausse de la voie de biosynthèse des lipoprotéines, dans les cellules de la granulosa, permettant la capture du cholestérol des lipoprotéines circulantes et sa conversion en progestatifs. D'ailleurs on observe une augmentation de l'expression des récepteurs LDL, et des gènes (principalement STARD1, CYP11A1 et HSD3B2) impliqués dans ce processus. Les cellules lutéiniques de la granulosa conservent aussi leur capacité de synthèse des œstrogènes à partir des précurseurs androgènes produits par les cellules de la thèque mais la baisse de sécrétion de LH est associée à une réduction considérable de la production de progestatifs et d'œstrogènes dans le corps jaune.

iv. Les cellules de la thèque

Les cellules de la thèque forment la couche externe des follicules à partir du stade de follicule secondaire. Elles produisent les androgènes qui sont convertis en œstrogènes par les cellules de la granulosa (cf. ci-dessus). Les cellules de la thèque sont spécifiées aux alentours de la naissance à partir de cellules localisées dans le stroma ovarien. Ces précurseurs ont pour origine des cellules mésenchymateuses du mésonéphros positives pour GLI1 (Glioma-associated oncogene homolog 1) et des progéniteurs gonadiques exprimant WT1 (215). Leur différenciation dépend de facteurs paracrines provenant de l'ovocyte (GDF9 pour Growth Differentiation Factor 9) et des cellules de la granulosa (IHH pour Indian HedgeHog/DHH pour Desert HedgeHog). D'ailleurs, les doubles KDs *Ihh* et *Dhh* entraînent un arrêt de la folliculogénèse au stade follicule pré-antral et sont associés à une absence complète de cellules de la thèque (215). Le KD de *Gdf9* chez la souris conduit également à un arrêt de la folliculogénèse au stade de follicule primaire. Il y a une croissance correcte des ovocytes avec formation de la zone pellucide mais comme pour *Dhh* et *Ihh* les cellules de la thèque sont absentes (216). De façon assez intéressante en absence de *Gdf9* l'expression d'*Ihh* ou *Dhh* est diminuée, ce qui pourrait expliquer l'observation de ces phénotypes assez similaires. Il est alors proposé que l'ovocyte produise GDF9, entraînant ainsi l'expression de *Dhh* et *Ihh* dans les cellules de la granulosa. La communication paracrine de ces facteurs serait alors associée à une différenciation des cellules stromales en cellules de la thèque. Ce type de régulation confirmerait que les cellules de la thèque et de la granulosa sont au centre d'un dialogue nécessaire à une folliculogénèse correcte.

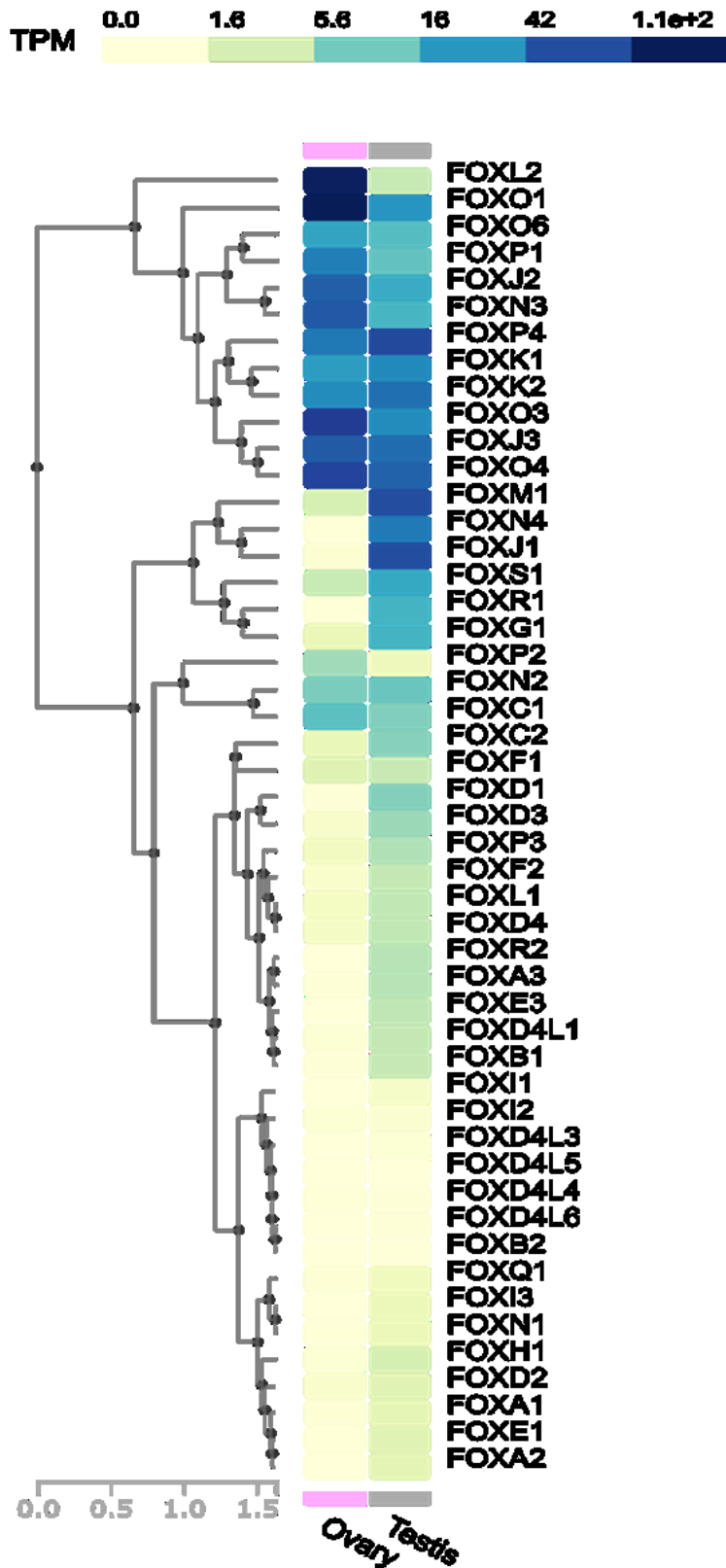


Figure 15 : Expressions normalisées de tous les facteurs FOX dans l’ovaire et le testis.

Figure réalisée via <https://www.gtexportal.org/home/>, niveaux d’expressions mesurés par RNA-seq et normalisée par la taille du transcrit chez l’humain. Plus la couleur tend vers le bleu plus l’ARN est présent, plus la couleur tend vers le jaune moins l’ARN est détecté.

B. Les facteurs forkhead et l'ovaire sain et pathologique

En 2011, Uhlenhaut et Treier publiaient une revue montrant qu'un grand nombre de FT *FOX* jouent un rôle dans la fonction de l'ovaire (217) (Table 3). Depuis, de nombreuses avancées ont été réalisées dans notre laboratoire et dans d'autres permettant d'améliorer la compréhension des facteurs *FKH* dans l'ovaire. Dans les paragraphes suivants, nous nous concentrerons sur les membres de la famille des *FOX* chez les mammifères qui ont été associés au développement des gonades féminines et à la folliculogénèse ovarienne jusqu'à présent. Une étude d'expression des facteurs *FKH* dans les ovaires et le testis montre qu'un grand nombre de ces facteurs sont exprimés dans les gonades, mettant en évidence leurs rôles importants au sein de ces organes (Figure 15).

Table 3 : [Tableau récapitulatif le rôle des facteurs FOX dans la fonction de l'ovaire en 2011 \(adaptée de Uhlenhaut, 2011\).](#)

Gene	Expression dans l'ovaire	Phenotype murin du KD	Maladie humaine associée à une perte de la fertilité
<i>FOXC1</i>	Cellules somatiques (granulosa et thèque)	Migration des cellules germinales primaires et fin de la folliculogénèse affectée	
<i>FOXL2</i>	Cellules de la granulosa et de la thèque	Défaut dans le développement des cellules de la granulosa. Acquisition d'un phenotype "Sertoli-like" pour les cellules de la granulosa	BPES, POF
<i>FOXO1</i>	Cellules de la granulosa (follicule antral)	?	POF?
<i>FOXO3</i>	Ovocytes du follicule primordial	Suppression de l'activation du follicule primordial altérée	POF?
<i>FOXO4</i>	Non caractérisé	Aucun phenotype	
<i>FOXO6</i>	Pas d'expression	?	

1. La famille des FOXO : facteurs clés de la croissance folliculaire

Les membres de la famille des facteurs FOXO sont fortement exprimés dans des cellules ovariennes spécifiques (218–220) et, en raison de leur capacité à réguler divers processus cellulaires (221), l'idée a été émise qu'ils soient des régulateurs clés de la croissance folliculaire et/ou de l'apoptose.

Foxo1 est fortement exprimé dans les cellules de la granulosa des follicules en croissance où les niveaux d'activine sont élevés (222). *Foxo1* est également exprimé dans les follicules en atresie où *Bmp2* est exprimée de façon préférentielle (219, 223). Des études sur des cellules de la granulosa en culture indiquent en outre que *Foxo1* peut réguler les gènes associés à la prolifération, à l'homéostasie métabolique et à l'apoptose (224, 225). Les souris knockout *Foxo1* ne dépassent pas le stade embryonnaire (176) empêchant l'étude de ses fonctions dans l'ovaire *in vivo*.

Foxo3 est exprimé dans les ovocytes où il contrôle la quiescence du follicule primordial. La perturbation du gène *Foxo3* entraîne une activation accrue du follicule (226, 227). De plus, les corps jaunes des souris knock-out conditionnelles *Pten* ont une expression élevée de *Foxo3* et présentent une durée de vie prolongée (228).

Foxo4 est faiblement exprimé dans les compartiments ovariens et les souris *Foxo4* nulles sont fertiles (227).

a) Les FOXOs : rôle dans les cellules de la granulosa et répression de la folliculogénèse

Les souris KO homozygotes pour *Foxo3* présentent une infertilité féminine liée à l'âge et à la présence de POF, mais le mécanisme sous-jacent est très différent de ce qui est décrit pour *Foxl2*. Chez les souris KO *Foxo3*, les follicules primordiaux sont assemblés normalement mais subissent ensuite immédiatement une activation globale, ce qui entraîne un épuisement précoce de tout le pool de follicules primordiaux (226, 227). Cela signifie que les jeunes femelles peuvent donner naissance à des portées de taille normale mais atteignent la ménopause beaucoup plus rapidement, suggérant que FOXO3 fonctionne en supprimant l'initiation de la croissance folliculaire et en contrôlant le taux d'utilisation du potentiel reproductif. Les follicules primordiaux peuvent être considérés comme étant dans un état d'arrêt du développement, et pour maintenir cet arrêt, FOXO3A semble être nécessaire. Dans les cellules de mammifères en culture, l'activation de FOXO3A induit également un arrêt réversible dans la phase G1 du cycle cellulaire (232). Pour maintenir cet état, il est important que les cellules arrêtées puissent se protéger contre d'éventuelles agressions, telles que le stress oxydatif.

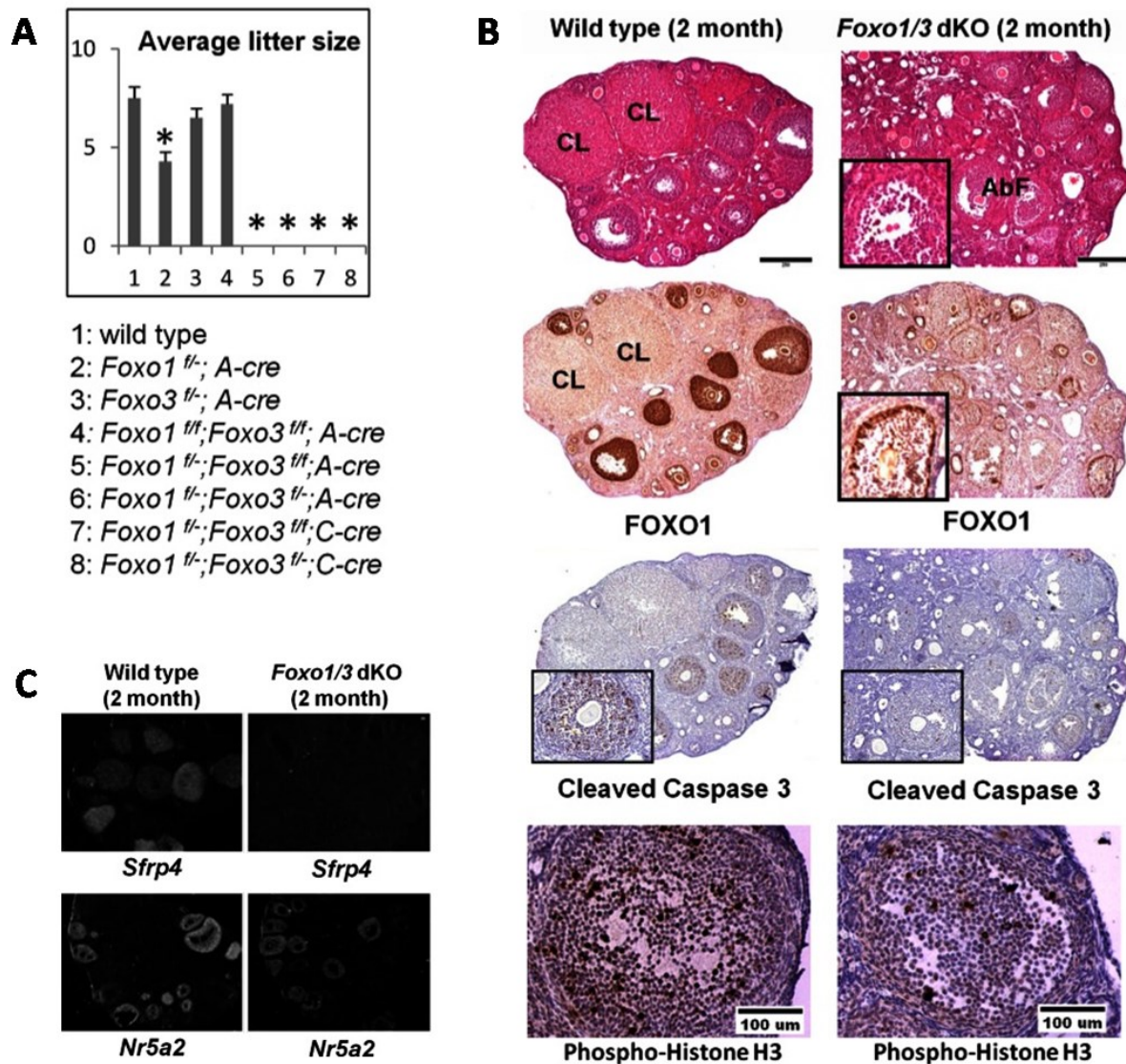


Figure 16 : **FOXO1 et FOXO3 participent à la maturation des cellules de la granulosa et des follicules.**

A. Etude de fertilité. Sur 6 mois les souris sauvages (1), déplétées pour *Foxo3* (3) et portant l'allèle Cre (2) présentent une fertilité similaire. Les souris déplétées pour *Foxo1* (2) sont légèrement sous-fertiles. En revanche les souris déplétées pour *Foxo1* et *Foxo3* sous l'induction de l'Amhr2-Cre (5, 6) ou sous l'induction de la Cyp19-Cre (7 et 8) sont infertiles. L'expérience est réalisée sur 4 à 7 souris par groupes.

B. Analyses histologiques des ovaires. Les coupes d'ovaires marquées à l'hématoxyline et l'éosine des souris témoins âgées de 2 mois (panel de gauche) ont plusieurs corps lutéaux (CL) ; les ovaires de souris mutantes *Foxo1/3* dKO âgées de 2 mois (panel de droite) sont dépourvus de corps lutéal et présentent une morphologie folliculaire anormale (AbF). Une réduction de la protéine FOXO1 est observée dans la plupart des cellules de granulosa, à l'exception des cellules de granulosa murales les plus externes dans certains gros follicules (encadré). La coloration de la caspase 3 clivée et de la phospho-histone H3 est réduite dans les follicules des souris mutantes par rapport aux témoins ; seules quelques cellules de certains follicules présentent une coloration positive dans les cellules de granulosa mutantes.

C. Expression de *Sfrp4* et *Nr5a2* dans les ovaires. L'hybridation *in situ* indique que les ovaires mutantes *Foxo1/3* expriment *Nr5a2*, un marqueur génétique fortement exprimé dans les cellules de granulosa des follicules en croissance et en ovulation, mais n'expriment pas *Sfrp4*.

Chez *C. elegans* et les cellules de mammifères, le gène codant la superoxyde dismutase 2 (SOD2 ; également connu sous le nom de MnSOD) - impliqué dans la protection contre le stress oxydatif - est régulé par DAF-16 et FOXO3A, respectivement, et il est nécessaire pour maintenir la quiescence (233).

En 2013, Liu et *al.* proposent une étude du rôle des facteurs FOXO1 et FOXO3 dans les cellules de la granulosa *in vivo*, en utilisant des souris portant des allèles floxés des gènes *Foxo1* et *Foxo3* précédemment publiés (229, 230). L'utilisation de ces modèles permet d'outrepasser le fait que les souris *Foxo1*^{-/-} ne dépassent pas le stade embryonnaire et que les souris *Foxo3*^{-/-} présentent une insuffisance ovarienne prématurée.

Les souris KD pour *Foxo1* (*Foxo1f*^{-/-};Amhr2-Cre) ou *Foxo3* (*Foxo3f*^{-/-};Amhr2-Cre) uniquement présentent une morphologie normale du follicule ovarien impossible à distinguer des souris de type sauvage mais sont respectivement légèrement subfertiles et fertiles. En revanche, les souris doublement mutantes, sont totalement stériles (Figure 16A). Les analyses histologiques des ovaires de souris témoins et de souris *Foxo1/3* dKO à l'âge de 2 mois montrent des différences marquées. Les ovaires des souris témoins contiennent des corps jaunes et des follicules à plusieurs stades de croissance, y compris de gros follicules antraux. En revanche, les ovaires mutants sont dépourvus de corps jaunes et les follicules présentent un aspect anormal dans lesquels les cellules de la granulosa sont délogées au centre de l'antrum (Figure 16B). Les ovaires des souris témoins présentent un immunomarquage intense de FOXO1 dans les cellules de la granulosa et les ovocytes des follicules, du stade secondaire au stade antral. La perte du gène *Foxo1* entraîne une baisse de la protéine FOXO1 dans la plupart des cellules de la granulosa ovarienne, à l'exception de la couche la plus externe des cellules de la granulosa murale dans certains grands follicules (Figure 16B). En raison de la faible expression basale de FOXO3 dans les cellules de la granulosa, aucune baisse de FOXO3 n'est visible dans les ovaires des souris mutantes. Cependant, les souris doublement mutantes présentent un phénotype beaucoup plus extrême que les simples mutants, FOXO3 exerce donc probablement des fonctions essentielles dans le développement des cellules de la granulosa et dans la différenciation des follicules. L'apoptose (suivie par immunocoloration de la caspase 3 clivée) et la prolifération (immunocoloration pour la phospho-histone H3) sont également réduites chez les souris *Foxo1/3* dKO par rapport aux témoins (Figure 16B). L'hybridation *in situ* à l'aide d'une sonde spécifique à *Sfrp4*, un gène fortement régulé à la hausse pendant le processus de lutéinisation, est positive uniquement dans les ovaires des souris sauvages où les corps jaunes sont présents (Figure 16C). En revanche, l'expression de *Nr5a2*, un gène fortement exprimé dans les cellules de la

granulosa des follicules en croissance et en ovulation, n'est pas modifiée chez les souris mutantes *Foxo1/3* (Figure 16C).

FOXO1 et FOXO3 participent donc ensemble à la fertilité féminine et à la maturation des cellules de la granulosa et des follicules, y compris lors de la lutéinisation.

b) La voie PI3K/AKT et l'inhibition de FOXO dans le contrôle du développement de l'ovocyte et du follicule

Parmi les différentes voies de régulation impliquées dans la régulation de l'ovogenèse, la voie de signalisation PI3K est un régulateur essentiel de la croissance, de la différenciation et de la survie des follicules (187). Des délétions de gènes impliqués dans cette voie sont associées à de la stérilité et à des POF confirmant leur rôle essentiel dans la préservation de la durée de vie reproductive normale des femmes (187). Parmi ces gènes on retrouve AKT qui lorsqu'il est phosphorylé contrôle l'activité de GSK3 (Glycogen synthase kinase 3) et de plusieurs membres de la famille FOXO (FOXO1, FOXO3a et FOXO4) (Figure 8).

Dans l'ovocyte, c'est la sécrétion de KL (kit ligand) par les cellules de la granulosa qui régule la phosphorylation de GSK3a et GSK3b par la voie PI3K/AKT. Comme dans d'autres types cellulaires (décrits précédemment), les facteurs FOXO sont également phosphorylés dans les cellules germinales en réponse à l'activation de la signalisation PI3K/AKT, et leurs fonctions transcriptionnelles sont désactivées par exclusion nucléaire. On en a parlé FOXO1, FOXO3 et FOXO4 jouent un rôle important dans la folliculogénèse. Les conséquences fonctionnelles de l'inactivation des FOXO par AKT sont donc similaires à ce qu'on a décrit précédemment (I.B.2.c).

2. Les facteurs FOXC

a) FOXC1 : la migration des cellules germinales primordiales et le développement du follicule antral

FOXC1 et FOXC2 font partie des gènes *FKH* associées à des phénotypes oculaires altérés chez la souris et chez l'humain. Les souris mutantes homozygotes *Foxc1* présentent une migration altérée des cellules germinales primordiales (PGC pour Primordial Germ Cell). Les PGC sont initialement spécifiées correctement en l'absence de FOXC1, mais ne migrent pas efficacement vers les crêtes génitales, de nombreuses PGC restant piégées dans l'intestin postérieur, en association à une gonade

en développement plus petite et désorganisée. La létalité néonatale des souris knock-out a été dépassée par des expériences de transplantation mais les follicules mutants *Foxc1*, chez les hôtes adultes de type sauvage, ne se développent pas au-delà des stades préantraux (234). *FOXC1* pourrait donc être nécessaire pour la maturation des follicules au-delà du stade préantral.

b) *FOXC1* et le maintien de la réserve ovarienne

Comme l'ovocyte et les cellules de la corona radiata interagissent étroitement, en 2012, May-Panloup et *al.* ont émis l'hypothèse que l'analyse des cellules de la corona radiata pourrait améliorer la compréhension de la pathogenèse de la diminution de la réserve ovarienne (DOR pour Diminished Ovarian Reserve) (235). Ils ont mené une étude de profils d'expressions génétiques basée sur des puces à ADN de cellules de la corona radiata isolées de complexes cumulus-ovocyte de femmes subissant une FIV par micro-injection intracytoplasmique (ICSI) pour identifier les gènes différentiellement exprimés entre les patientes ayant une réserve ovarienne normale (NOR pour Normal Ovarian Reserve) et celles ayant une DOR. Ils ont identifié 48 gènes différentiellement exprimés comprenant *FOXC1* exprimé à un niveau significativement plus élevé dans le groupe NOR. Enfin une analyse plus poussée leur a permis de considérer deux sous-groupes distincts de patientes atteintes de DOR, à savoir, DOR Gr1 et DOR Gr2. La comparaison de ces deux sous-groupes de patientes en fonction de leurs caractéristiques cliniques et biologiques, a permis de distinguer que la covariable qui les séparait était le niveau E2 de base, qui était significativement plus élevé chez les patientes DOR Gr2. Selon la version 2 de la « Dragon Estrogen Response Genes Database », huit des onze gènes différentiellement exprimés entre les sous-groupes DOR Gr1 et DOR Gr2 ont été considérés comme des gènes sensibles aux œstrogènes, à savoir *CITED2*, *CTGF*, *GAS1*, *GBP2*, *PTGS2*, *SOCS2*, *VCAN* et *FOXC1*, poussant à considérer *FOXC1* comme jouant un rôle dans le maintien de la réserve ovarienne.

4. Cancers ovariens et résistance aux traitements

a) Les différents types de cancers de l'ovaire

i. Généralités sur les cancers de l'ovaire

Le cancer des ovaires (CO) représente environ 239 000 nouveaux cas et 152 000 décès dans le monde chaque année (236). Les symptômes de la maladie se présentent généralement à un stade tardif et le taux de survie à 5 ans n'est que de 29%. Malheureusement, peu de cas (15 %) sont diagnostiqués avec une tumeur localisée (stade 1) mais lorsque c'est le cas, le taux de survie à 5 ans est de 92% (237).

Les tumeurs ovariennes bénignes et malignes ont pour origine l'un des trois types cellulaires composant l'ovaire : les cellules épithéliales, les cellules stromales et les cellules germinales. Plus de 90 % des tumeurs ovariennes malignes sont d'origine épithéliale, 5 à 6 % des tumeurs sont des tumeurs des cordons sexuels (par exemple, la granulosa), et 2 à 3 % sont des tumeurs des cellules germinales (par exemple, les tératomes, les dysgerminomes, etc.). La pathologie et la classification des tumeurs ovariennes sont décrites en détail par Chen *et al.* (238). La plupart des recherches épidémiologiques se concentre sur les cancers d'origine épithéliale. Ces cancers sont très hétérogènes avec des sous-types histologiques (histotypes) qui diffèrent par leurs origines, pathogènes, altérations moléculaires, expressions des gènes et le pronostic.

Les tumeurs des cellules germinales sont rares et ne représentent que 3 % de tous les cas de cancer des ovaires. Elles sont généralement diagnostiquées à un jeune âge, l'âge moyen se situant entre 10 et 30 ans (239). Les tumeurs des cellules germinales présentent les mêmes symptômes généralement vagues que les autres types de cancer de l'ovaire, tels que le gonflement de l'abdomen et les saignements vaginaux irréguliers (239).

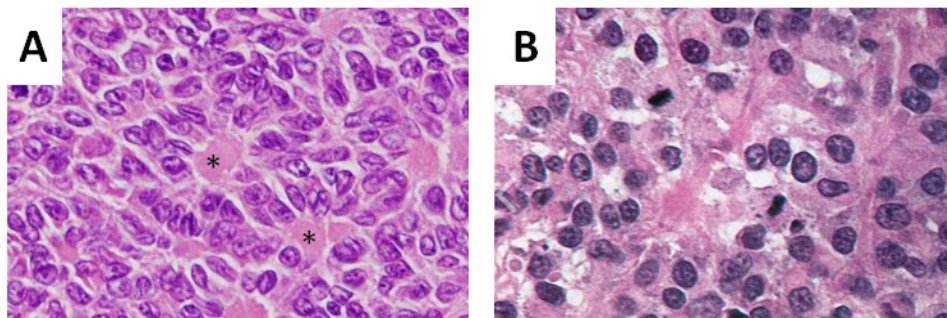


Figure 17 : **Caractéristiques cellulaires des tumeurs des cellules de la granulosa adulte et juvénile.**

A. Cellules tumorales issues d'une AGCT. Les cellules tumorales possèdent des noyaux en formes de grains de café. Les cellules sont généralement disposées autour d'une cavité centrale (*) appelée corps de Call et Exner et présentent un schéma de croissance microfolliculaire similaire à celui des follicules primordiaux et contiennent des matériaux éosinophiles ainsi que des débris nucléaires.

B. Cellules tumorales issues d'une JGCT. Les cellules tumorales possèdent un abondant cytoplasme éosinophile et rond et un noyau hyperchromatique. Au centre on peut voir deux mitoses caractéristiques de ce genre de tumeurs très agressives.

ii. Les tumeurs des cordons sexuels

Les tumeurs du cordon sexuel sont peu courantes et diffèrent cliniquement des tumeurs épithéliales. Elles apparaissent souvent à un âge avancé et les patientes présentent souvent des symptômes liés aux hormones. La plupart est associée à un cours clinique indolore. Les tumeurs des cordons sexuels sont classées en 3 catégories principales : stromale pure, les tumeurs du cordon sexuel pur et des tumeurs mixtes cordon sexuel-stroma. La rareté, le chevauchement de l'histomorphologie et du profil immunologique des différentes tumeurs des cordons sexuels contribuent souvent aux difficultés de diagnostic.

Dans les tumeurs du cordon sexuel pur, on retrouve les tumeurs des cellules de la granulosa adulte et juvénile. Les tumeurs des cellules adultes de la granulosa (AGCT pour Adult Granulosa Cell Tumor) touchent des femmes d'âge moyen (pic à la cinquantaine) et la manifestation endocrinienne la plus courante de l'AGCT est un hyperœstrogénisme qui entraîne un saignement anormal de l'utérus. La forme adulte présente généralement des microfollicules ou des motifs solides avec des cellules assez uniformes, anguleuses ou ovales, avec un cytoplasme peu abondant et des noyaux fades et pâles avec des rainures (240) (Figure 17A). La mutation principale associée aux AGCTs concerne un facteur *FOX* (*FOXL2*). La caractérisation de cette mutation sera décrite à la fin de l'introduction.

Ces caractéristiques ne sont pas observées dans les tumeurs juvéniles (JGCT pour Juvenile Granulosa Cell Tumor). Les JGCTs sont spécifiques aux enfants et aux jeunes adultes, et, lorsqu'elles apparaissent chez les enfants prépubères, les patientes présentent souvent une pseudo-précocité isosexuelle. Histologiquement, les JGCTs montrent un myxoïde ou un œdème stromal et un schéma macrofolliculaire spécifique (les follicules sont irréguliers et contiennent des substances éosinophiles ou basophiles) (Figure 17B). Les corps de Call et Exner sont absents. Contrairement aux AGCTs, aucune mutation dans *FOXL2* n'est retrouvée. Les 2 types de mutations les plus courantes dans les JGCTs sont dans la sous-unité alpha de la protéine G à la position 201, retrouvées dans jusqu'à 30 % des JGCTs, et des duplications en tandem ou des mutations ponctuelles dans l'exon 3 de *AKT1* (241, 242).

b) FOXC2 : rôle dans la transition mésenchymato-épithéliale, la migration et l'invasion

En 2014 Liu et *al.* étudient l'expression de *FOXC2* dans six lignées de cellules cancéreuses ovariennes (NOS4, K2, TAOV, OVSAHO, ES-2 et SKOV3) (243). Ils observent une surexpression de *FOXC2* dans les cellules ES-2 et SKOV3 qui sont les cellules les plus envahissantes. Ils ont également analysé l'expression de *FOXC2* dans des tissus ovariens normaux et cancéreux par immunohistochimie. Les tissus ovariens normaux humains n'ont pas montré de propriétés d'immunomarquage, en revanche ils constatent une forte expression de *FOXC2* dans certains tissus cancéreux, et ce niveau d'expression est corrélé avec le caractère métastatique des tumeurs. Cela suggère que l'expression de *FOXC2* peut être induite pendant la progression de la tumeur ou que *FOXC2* a une fonction causale dans la dissémination métastatique. *FOXC2* est un facteur inducteur de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) qui a été détecté dans le cancer du sein (244). De plus *FOXC2* est fortement exprimé dans les tissus mésenchymateux, suggérant qu'il permettrait aux cellules cancéreuses de se développer dans des environnements favorables à l'invasion et aux métastases (245). Pour déterminer si l'expression de *FOXC2* contribue ou non à la TEM des cellules cancéreuses de l'ovaire, ils réalisent le KD par siRNA l'expression de *FOXC2* dans les cellules où il est fortement exprimé (ES-2 et SKOV3). Ce KD induit une récupération de l'adhérence entre les cellules laissant apparaître une morphologie cellulaire similaire à celles des cellules épithéliales avec une re-localisation de la E-cadhérine. En parallèle l'expression de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux a été mesurée dans les KD *FOXC2* des cellules ES-2 et SKOV3 qui présentent une up-régulation d'E-cadherine (marqueur épithélial) et une baisse de la vimentine (marqueur mésenchymateux). Ces résultats indiquent que *FOXC2* est important pour les cellules SKOV3 et ES-2 afin de maintenir les caractéristiques mésenchymateuses. Des tests de migration et d'invasion viennent compléter l'étude montrant qu'une expression élevée de *FOXC2* participe à une migration et une invasion accrues.

c) FOXA1 et le cancer des cellules épithéliales ovariennes

FOXA1 joue un rôle important dans le métabolisme, le développement des organes et les maladies. Des recherches sur des modèles de souris ont montré que chez les souris adultes, les organes et les tissus différenciés de l'endoderme, du mésoderme ou de l'ectoderme expriment tous *FOXA1* (246, 247). Dans le développement des organes, le rôle de *FOXA1* est évident dans les organes à récepteurs hormonaux positifs tels que le sein et la prostate. Le même rôle a été signalé pour

FOXA1 dans le développement des reins, du cerveau et du tractus gastro-intestinal (247, 248). En 2017, Wang et al. se sont intéressés au rôle de FOXA1 dans le cancer épithélial de l'ovaire. En comparant un tissu ovarien sain et un tissu cancéreux et ils constatent une augmentation de l'expression de FOXA1 dans ce dernier. Ils montrent que si FOXA1 est inhibé (en condition siFOXA1) dans les lignées cellulaires de cancer ovarien la prolifération cellulaire est diminuée alors qu'il y a une induction de l'apoptose et un arrêt de la phase S. De plus l'absence de FOXA1 est associée à une inhibition de la migration et de l'invasion des cellules (249).

d) Facteurs FOX et la résistance aux chimiothérapies

i. FOXC2 et la résistance au cisplatine dans des lignées de cancer épithélial ovarien

En 2016, Li et al. complètent l'étude de FOXC2 avec l'analyse de lignée résistante au cisplatine (250). Ils montrent qu'en comparaison de la lignée cellulaire parentale SKOV3, SKOV3/CDDP (lignée résistante au cisplatine) présente un phénotype de TEM et possède des caractéristiques invasives. Les tests de gain et de perte de fonction ont indiqué que le KD de FOXC2 médié par shRNA pourrait inverser la TEM et réduire la capacité de migration, d'invasion, d'attachement et de détachement dans la lignée cellulaire SKOV3/CDDP alors que la régulation à la hausse de FOXC2 pourrait induire les effets inverses dans la lignée cellulaire parentale SKOV3. En outre, ils ont constaté que l'activation des voies de signalisation ERK ou AKT/GSK-3 β était impliquée dans la TEM favorisant l'expression de FOXC2 dans les cellules cancéreuses ovariennes résistantes à la cisplatine. Toutes ces données montrent que FOXC2 pourrait être induire le phénotype TEM dans les cellules cancéreuses ovariennes résistantes au cisplatine et fait de lui une cible thérapeutique potentielle pour le traitement des stades avancés du cancer de l'ovaire (250).

ii. FOXM1 et la résistance à la chimiothérapie

Comme abordé dans la partie I plusieurs études montrent que le FT FOXM1 est largement exprimé dans les tumeurs, agissant comme un promoteur principal de la progression du cycle cellulaire, de la réponse aux lésions de l'ADN et de la résistance aux médicaments et sa surexpression confère des avantages prolifératifs aux cellules cancéreuses (110). En 2017, Tassi et al. montrent une surexpression significative de l'ARNm de FOXM1 dans les cellules des cancers épithéliaux ovariens (CEO) (251). Cette surexpression de FOXM1 est significativement corrélée à l'histologie séreuse (p =

0,001) et à un stade tumoral avancé ($p = 0,004$). Des analyses multivariées ont confirmé que la surexpression de la protéine FOXM1 était un indicateur de la dégradation de la survie spécifique de la maladie dans les CEO non séreux, et du temps plus court avant la rechute dans les cas de résistance au cisplatine. En revanche le KD de *FOXM1* dans les lignées cellulaires des CEO est associé à une inhibition de la croissance cellulaire et la clonogénicité, rendant les cellules plus sensibles aux effets cytotoxiques des composés du cisplatine et d'autres agents chimiothérapeutiques. Des analyses par microarray et RT-qPCR de transcriptomes de cellules KD pour *FOXM1* ont révélé la dérégulation de plusieurs cibles connues de FOXM1 communes mais aussi des cibles uniques spécifiques à ces lignées, impliquées dans le cycle cellulaire, les métastases, la réparation de l'ADN et la réponse aux médicaments, soutenant le rôle de FOXM1 dans le processus cancérigène (251).

L'ovaire est un organe complexe où un grand nombre de FT joue un rôle. On l'a vu dans la partie I., le rôle des FT et notamment des facteurs *FOX* est essentiel à une variété de mécanismes cellulaires et la moindre mutation ou dérégulation peut entraîner un effet drastique sur l'organisme entier ou sur un type cellulaire. Dans l'ovaire, le FT central est FOXL2. Dans la partie suivante, je vais m'attarder sur ce facteur, son rôle dans l'ovaire et les conséquences de ses mutations dans la fonction de l'ovaire sain ou pathologique.

C. FOXL2, un facteur de transcription essentiel des cellules de la granulosa

1. Le facteur FOXL2 : généralités

FOXL2 code un FT appartenant à la famille des facteurs *FOX*. *FOXL2* interagit avec la séquence ADN consensus des forkhead 5'-(G/A)(T/C)(C/A)AA(C/T)A-3' et aussi avec une séquence plus spécifique 5'-GT(C/G)AAGG-3', appelée FLRE (pour *FOXL2* Response Element) (252). Les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage à haut débit (ChIP-seq) montrent que les régions génomiques reconnues par *FOXL2* (contenant ou non le consensus) ont tendance à correspondre aux unités de transcription et aux introns de ses gènes cibles et moins clairement aux sites de démarrage de la transcription (118). Chez l'être humain, les mutations de *FOXL2* se retrouvent principalement à l'état hétérozygote dans deux types de pathologies : le Blépharophimosis Ptosis Epicanthus (BPES) et les AGCT (décrites précédemment). Diverses études montrent que *FOXL2* est exprimé dans le mésenchyme périoculaire pendant le développement de la paupière (253, 254) ainsi que dans les cellules folliculaires émergentes et établies pendant le développement ovarien (211, 253).

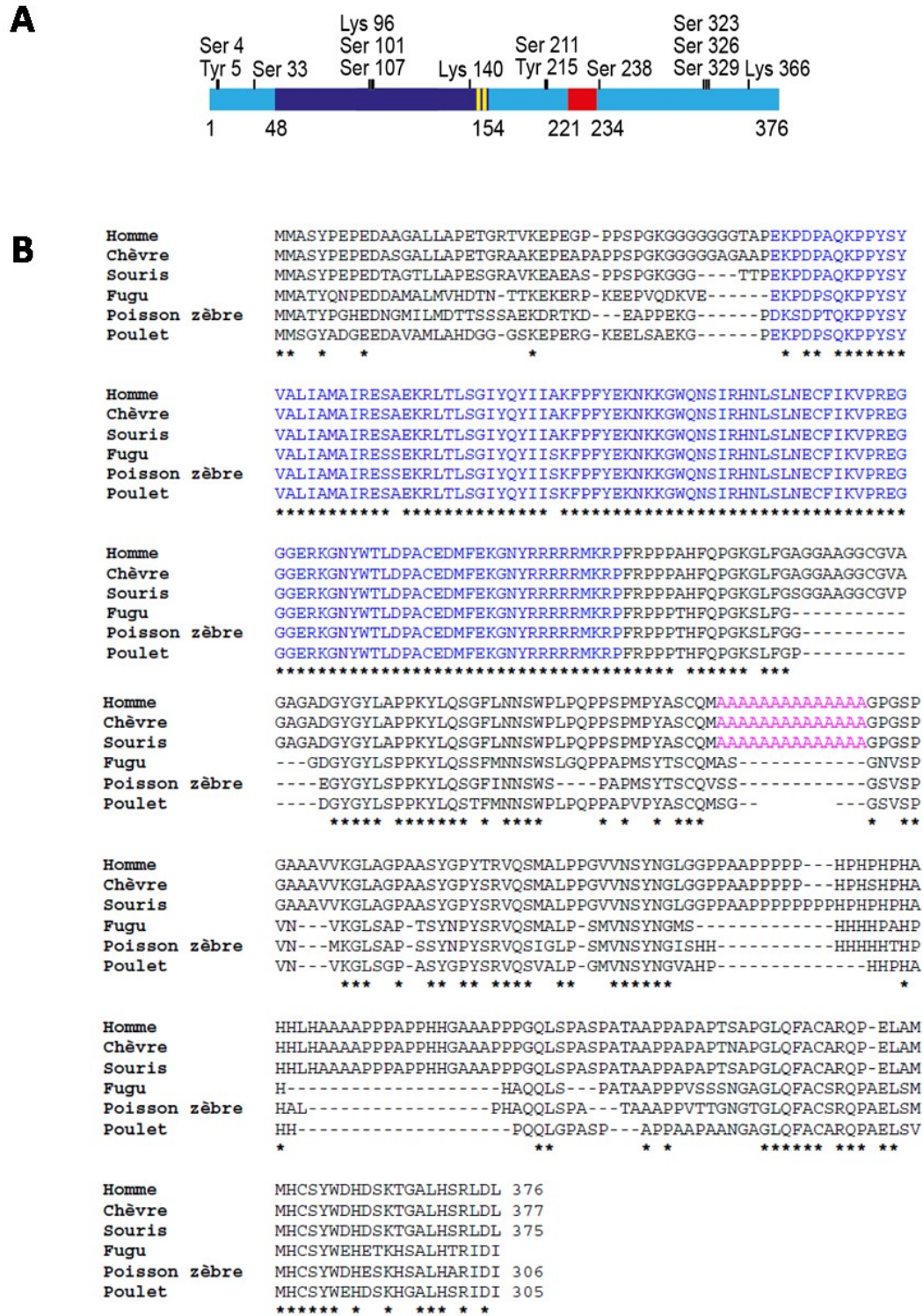


Figure 18 : La protéine FOXL2 est hautement conservée et possède plusieurs sites soumis à modifications post-traductionnelles.

A. Représentation schématique de l’organisation de la protéine FOXL2 humaine et de ses sites soumis à modifications post-traductionnelles. En bleu le domaine forkhead, en jaune les séquences NLS et en rouge le domaine poly-alanine.

B. Alignement des séquences protéiques de FOXL2 chez les Vertébrés (d’après Cocquet et al.). Les séquences humaine, caprine, murine, du fugu, du poisson zèbre et du poulet ont été alignées. * marque les positions conservées. – marque l’absence d’un acide aminé. Le domaine *FKH* est signalé en bleu et le domaine polyalanine, conservé chez l’homme, la chèvre et la souris est signalé en rose.

a) FOXL2 : structure et conservation

i. Structure protéique et modifications post-traductionnelles

Chez l'humain, le gène FOXL2 code une protéine de 376 acides aminés contenant un domaine *FKH* de liaison à l'ADN (Figure 18A) (254).

En C-terminale du domaine *FKH* se trouvent deux séquences NLS, une à motif non conventionnel débutant à la lysine 125 (KGNWTLDPACEDMFEGKGY) et une riche en arginine et lysine débutant à l'arginine 144 (RRRRRMKR) (255, 256).

La protéine FOXL2 contient également un domaine polyalanine constitué d'une répétition homogène de 14 résidus alanines, situé en aval du domaine *FKH* et dont la fonction est à ce jour encore inconnue (Figure 18A).

Au sein du laboratoire, il a été réalisé une analyse de profil des modifications post-traductionnelles de FOXL2 (257) (Figure 18A). L'analyse en électrophorèse bidimensionnelle de FOXL2 suggère que cette protéine est hautement modifiée et principalement phosphorylée, acétylée et SUMOylée (257, 258). D'ailleurs la régulation de l'expression et de la fonction de FOXL2 pourrait passer par une régulation de sa stabilité *via* ces modifications, de façon assez similaire à la régulation d'autres protéines *FOX*.

ii. Conservation

Au vu de leurs rôles majeurs dans la régulation d'un grand nombre de processus cellulaires, les facteurs *FOX* sont très souvent conservés entre espèces. Pour FOXL2, des études de séquences nucléotidiques et protéiques ont été réalisées dans plusieurs espèces. Les analyses des ORF (Open Reading Frame ou phase ouverte de lecture en français) chez l'humain, la souris, la chèvre et le fugu ont montré que le gène était soumis à une forte pression de sélection (253). Entre les mammifères, la séquence en acides aminés présente d'ailleurs une similarité de plus de 96%. De façon attendue, le domaine *FKH*, présente une très forte conservation, seuls trois sérines chez le fugu n'étant pas conservés chez les autres (changement en alanines) (Figure 18B) (253). Cependant, les sérines étant des sites phosphorylables, ce changement entraîne une perte de trois sites intéressants reflétant potentiellement une régulation différente entre espèces. On constate que la région N-terminale de la protéine est elle aussi très conservée, suggérant l'existence d'une séquence nécessaire à la structure et/ou la fonction même de la protéine.

La région C-terminale semble être soumise à une sélection moins importante avec une séquence protéique divergeant dans cette région, excluant la région polyalanine qui est strictement conservées chez les mammifères euthériens. Ceci suggère une nouvelle fois, la présence de contraintes fonctionnelles ou structurelles associées à ce domaine encore peu décrit.

b) Expression et régulation de FOXL2

FOXL2 est exprimé majoritairement dans les ovaires, les paupières et l'hypophyse (chez l'être humain, la chèvre et la souris). En revanche, aucune expression n'a été détectée dans le testicule suggérant une expression dimorphique dans les gonades associées au sexe. D'autre part, les données Genes Expression Omnibus suggèrent qu'une grande variété de tissus exprime FOXL2 à un niveau relativement élevé : les cellules souches hématopoïétiques, les macrophages activés, certaines cellules du foie, les cellules du cancer du colon à différents stades, ... FOXL2 est exprimé très tôt au cours du développement et son expression est maintenue à l'âge adulte similairement aux autres facteurs *FOX*.

i. Expression dans les paupières

Dans les paupières en développement FOXL2 présente une expression dans le mésenchyme primordial (253). L'expression de *Foxl2* est maximale entre 13.5 et 15.5 jpc chez la souris, en concordance avec le stade du développement palpébral chez la souris (254). Son expression est cependant maintenue même à l'âge adulte. En raison de son implication dans le BPES, syndrome autosomique dominant se manifestant en premier lieu par des malformations palpébrales qui peuvent être associées à une ménopause prématurée (BPES de type I) ou non (BPES de type II), FOXL2 pourrait également jouer un rôle dans le développement des muscles élévateurs supérieurs de la paupière (259). En effet les deux types de BPES sont causés par une mutation ou une délétion du gène FOXL2 dans près de 90% des cas, et dans 70% ces mutations sont intragéniques (260).

ii. Expression dans l'hypophyse

L'expression de *Foxl2* dans l'hypophyse a été décrite avant même que FOXL2 soit identifié et décrit comme FT *FOX*. En effet, en 1998, Prfk est décrit comme FT jouant un rôle de marqueur ventral de l'hypophyse (261). En 2006, une étude plus précise montre que *Foxl2* est exprimé à partir de 11.5

jpc au niveau du lobe antérieur hypophysaire. Cette expression persiste pendant le développement et à l'âge adulte comme dans les autres organes (262).

Foxl2 est exprimé dans les cellules quiescentes, différenciées ou non, suggérant un rôle dans la différenciation des cellules de l'hypophyse. Puis une fois l'hypophyse mis en place, *Foxl2* est exprimé exclusivement dans les cellules gonadotropes (sécrétrice des gonadotrophines), thyrotropes (sécrétrices de TSH : Thyroid Stimulated Hormone) et une partie des cellules lactotropes pendant la gestation.

iii. Expression dans l'ovaire

Dans les ovaires l'expression de *FOXL2* est détectée dans certaines cellules des crêtes génitales femelles à partir de la septième semaine de développement. *FOXL2* est ensuite exprimé tout au long de la folliculogénèse, du stade du follicule primordial au stade du follicule pré-ovulatoire. Son expression est cependant très restreinte aux cellules de la granulosa. Ce profil d'expression est retrouvé chez la chèvre et la souris (116, 253), chez certains poissons (263), chez le poulet (264) et chez la tortue (265). Cette conservation dans le profil d'expression suggère un rôle majeur de *FOXL2* dans la différenciation et le développement de l'ovaire et principalement des cellules de la granulosa, qui fera l'objet d'un approfondissement ci-dessous.

iv. Modifications post-traductionnelles

Comme les facteurs *FKH* déjà décrits, *FOXL2* est modifié post-traductionnellement (Figure 18B). Ces modifications modulent l'expression, la localisation et l'activité du substrat (exemple de FOXO partie I). En 2009, alors que la position des résidus modifiés de *FOXL2* n'est pas clairement établie ni leurs rôles dans l'activité de *FOXL2*, l'acétylation est proposée comme nécessaire à l'activation par *FOXL2* d'un certain nombre de gènes alors que d'autres cibles seraient activées par la forme non-acétylée, suggérant une régulation fine des cibles par *FOXL2*. SIRT1, enzymes de déacétylation pourrait ainsi réguler directement l'action de *FOXL2* (258).

Concernant la phosphorylation, l'inactivation de *Lats1* par RNAi est associée à une diminution du niveau de phosphorylation de FOXL2 et à une faible baisse d'activité de FOXL2 sur un promoteur rapporteur (266) mais les résidus de FOXL2 phosphorylés par LATS1 n'ont pas été identifiés. LATS1 est un suppresseur de tumeur connu et un régulateur majeur de la voie HIPPO, voie impliquée dans plusieurs types de cancers (267). De façon intéressante, les souris KO pour *Lats1* présentent une quasi absence de follicules antraux, associée à une faible atrophie folliculaire et à des tumeurs ovariennes d'origines stromales. Cependant les auteurs suggèrent que les défauts de fertilité pourraient résulter de l'apparition des tumeurs et être ainsi un phénotype secondaire (268).

Enfin pour finir, FOXL2 est aussi SUMOylée, une modification proche de l'ubiquitination où une protéine SUMO (il en existe 4) interagit de façon covalente avec une autre protéine. Pour que cette modification ait lieu, une E2-ligase, UBC9, catalyse la fixation de la protéine SUMO sur le substrat protéique puis une E3-ligase stabilise la formation du complexe et permettrait de déterminer une spécificité de substrat *in vivo* (269). L'interaction directe de FOXL2 avec UBC9 et PIAS1, une E3-ligase a été mise en évidence (270). Le rôle de la SUMOylation de FOXL2 a été étudié au laboratoire, notamment pour identifier l'effet sur la localisation subcellulaire, la stabilisation et l'action transcriptionnelle du facteur (257). Plusieurs approches ont été utilisées dont l'utilisation d'enzymes de désomoylation et d'une forme de FOXL2 « sous-SUMOylable ». Ces expériences ont montré que la SUMOylation de FOXL2 est nécessaire pour l'activation transcriptionnelle de deux promoteurs rapporteurs. Même si plusieurs résidus potentiellement SUMOylés ont été identifiés sur FOXL2, il apparaît que l'effet de la SUMOylation soit plutôt associé à une stabilisation de la protéine et par conséquent une augmentation de son activité transcriptionnelle, avec une répression accrue sur certaines cibles ou une sur-activation d'autres (270). L'utilisation d'une version de FOXL2 artificiellement SUMOylée montre que cette forme est recrutée dans les larges corps subnucléaires sans présenter d'aggrégation. Le recrutement de FOXL2 au niveau des corps nucléaires à PML est SUMO-dépendant et FOXL2 interagit directement avec SP100, une protéine constitutive de ces corps. Il a été suggéré que ce recrutement au PML était associé à un dépôt de marques post-traductionnelles sur FOXL2. La recherche de modifications post-traductionnelles de FOXL2 par spectrométrie de masse a montré 8 nouveaux sites de modifications post-traductionnelles. En revanche la mutation individuelle de chacun des résidus n'a pas permis de retrouver d'effet similaire à une perte de la SUMOylation sur les promoteurs testés.

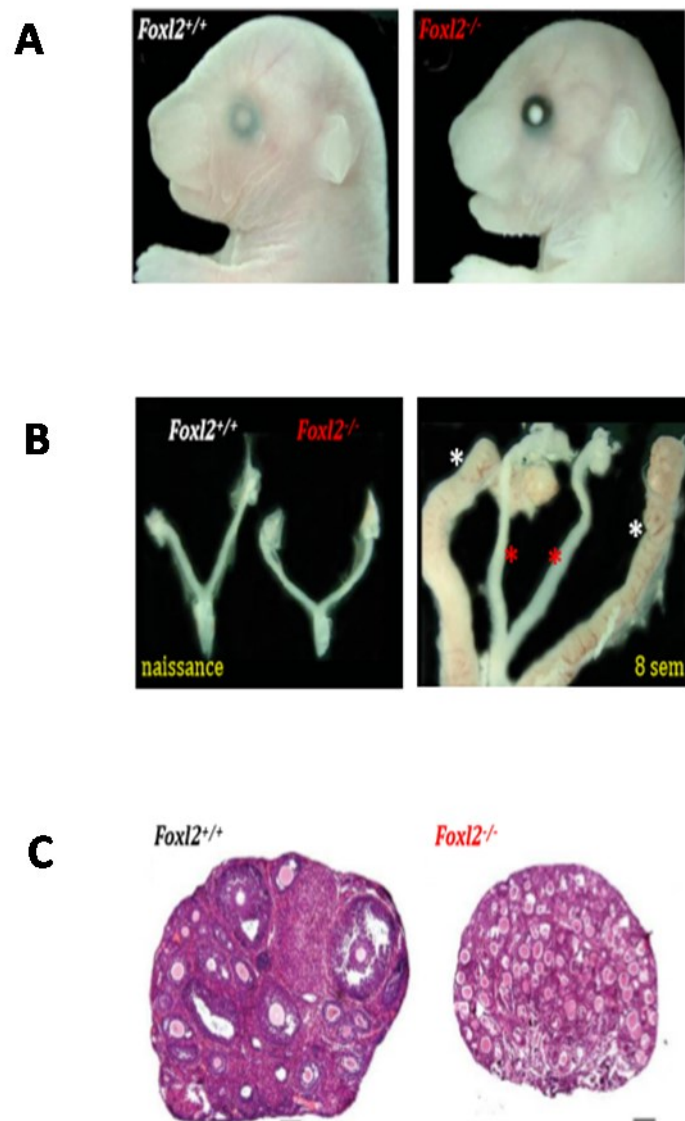


Figure 19 : **Phénotypes de l'invalidation totale de Foxl2 chez la souris (adapté de Uda et al., 2004).**

L'invalidation totale de Foxl2 (*Foxl2*^{-/-}) induit une hypoplasie sévère des paupières (A) et des cornes utérines (B). Le tractus génital des souris *Foxl2*^{-/-} est semblable à celui des souris contrôles (*Foxl2*^{+/+}) à la naissance, mais il reste hypoplasique par la suite. (C) Dans l'ovaire, la folliculogenèse est bloquée au stade follicule primordial. Les cellules de la pré-granulosa conservent une forme allongée et ne se différencient pas. Les ovocytes entrent anormalement en croissance.

2. FOXL2 : rôle dans le développement et la mise en place de l'ovaire

Il existe deux modèles murins KO constitutifs pour *Foxl2*, produits indépendamment en 2004. Dans le premier KO toute la séquence codante de *Foxl2* a été enlevée (195), tandis que dans le second la séquence a été remplacée par le gène rapporteur LacZ (116). Dans les deux études, les souris dépourvues de *Foxl2* présentent une létalité périnatale élevée, un retard de croissance, une hypoplasie sévère des paupières et des altérations du tractus génital féminin (Figure 19A et B). Les ovaires sont histologiquement normaux jusqu'à une semaine après la naissance. À deux semaines, la taille des ovaires est réduite et des différences apparaissent dans le développement des cellules de la granulosa (GC pour Granulosa Cells) et des ovocytes (Figure 19C). La croissance des ovocytes est retardée et ils ne sont entourés que d'une unique couche de GC plates, qui n'effectuent pas la transition squameuse à cuboïdale observée dans les follicules contrôles. Uda *et al.* ont remarqué que certains des ovocytes restaient dans des nids dans la région corticale comme s'il y avait un défaut dans la décomposition des kystes ovocytaires. FOXL2 est donc nécessaire pour la formation et l'activation correcte des follicules, la décomposition des kystes ovocytaires, la synthèse de la lame basale et la différenciation des pré-GC. Cela correspond d'ailleurs au phénotype ovarien observé chez une patiente de 19 ans atteinte de BPES et porteuse de la mutation c.947-957del11 présentant des follicules primordiaux, transitoires et primaires (271). Certains follicules sont regroupés dans des nids avec deux ovocytes, et les follicules secondaires présentent des couches de GC irrégulières. Le phénotype ovarien cependant moins drastique chez cette patiente BPES, mais aussi chez les autres, pourrait être dû à l'état hétérozygote de la mutation (271) et donc associé à une haplo-insuffisance de FOXL2.

Il est intéressant de noter que l'absence de fonction de FOXL2 pourrait être la cause sous-jacente de l'inversion de sexe de femelle à mâle observée chez les chèvres atteintes du « polled Intersex syndrom » (PIS), qui présentent une délétion chromosomique englobant des éléments non codants ~200 kb en amont de *FoxL2* et qui influencent sa transcription. Chez les chèvres, la mutation PIS semble affecter l'expression de *FoxL2*, ce qui entraîne une dé-répression de la voie de détermination du sexe mâle. De plus, les 11,7 kb déplétés chez les chèvres mutantes correspondent à une séquence non-génique conservée en amont du gène *FOXL2* humain dont la délétion est associée au BPES. L'existence d'un élément régulateur distant conservé, nécessaire à la bonne expression de *FOXL2*, se trouvant loin en amont du gène et contenant la région homologue au PIS est donc très probable (272).

a) FOXL2 et le maintien des cellules de la granulosa

Le KO de *Foxl2* induit chez des souris femelles âgées de 8 semaines a mis en évidence la plasticité de l'identité sexuelle gonadique (117). En effet, 3 semaines après l'induction de la délétion de *Foxl2*, une trans-différenciation des ovaires a été observée, avec des follicules sans ovocytes ressemblant à des tubules séminifères. Une étude transcriptomique réalisée à ce stade a montré une régulation à la hausse des marqueurs testiculaires, notamment SOX9.

Dans le KO induit, les GC ont été comme « reprogrammées » en cellules de type Sertoli et les cellules de la thèque en cellules de type Leydig, capables de produire la testostérone (117). Ce phénomène est tout de même en contraste avec l'absence d'inversion de sexe retrouvé dans les KO constitutifs de *Foxl2* (présentés ci-dessus). Une explication, proposée par Maatouk et ses collègues, pourrait être que la transdifférenciation des GC implique que celles-ci soient matures (273). Ce résultat montre que l'identité d'un type cellulaire n'est pas forcément irréversiblement établie au cours de la vie foetale mais qu'elle doit être maintenue tout au long de la vie.

b) Cibles transcriptionnelles et modes d'actions de FOXL2

On l'a introduit au début de l'introduction, la caractérisation d'un FT et de son action nécessite la détermination des gènes dont il régule la transcription. A l'échelle du génome, cela implique de connaître les sites de fixations sur l'ADN du FT étudié bien que cette fixation ne suffise pas à présager la régulation de la transcription d'un gène à proximité. En effet, comme cela a été présenté précédemment, les éléments régulateurs sont souvent situés à grande distance des gènes qu'ils régulent et le lien entre éléments régulateurs et gènes est donc difficile à établir. De plus plusieurs facteurs et plusieurs éléments régulateurs peuvent être nécessaires pour réguler la transcription d'un gène. Ainsi les sites de fixation doivent être mis en parallèle des gènes régulés.

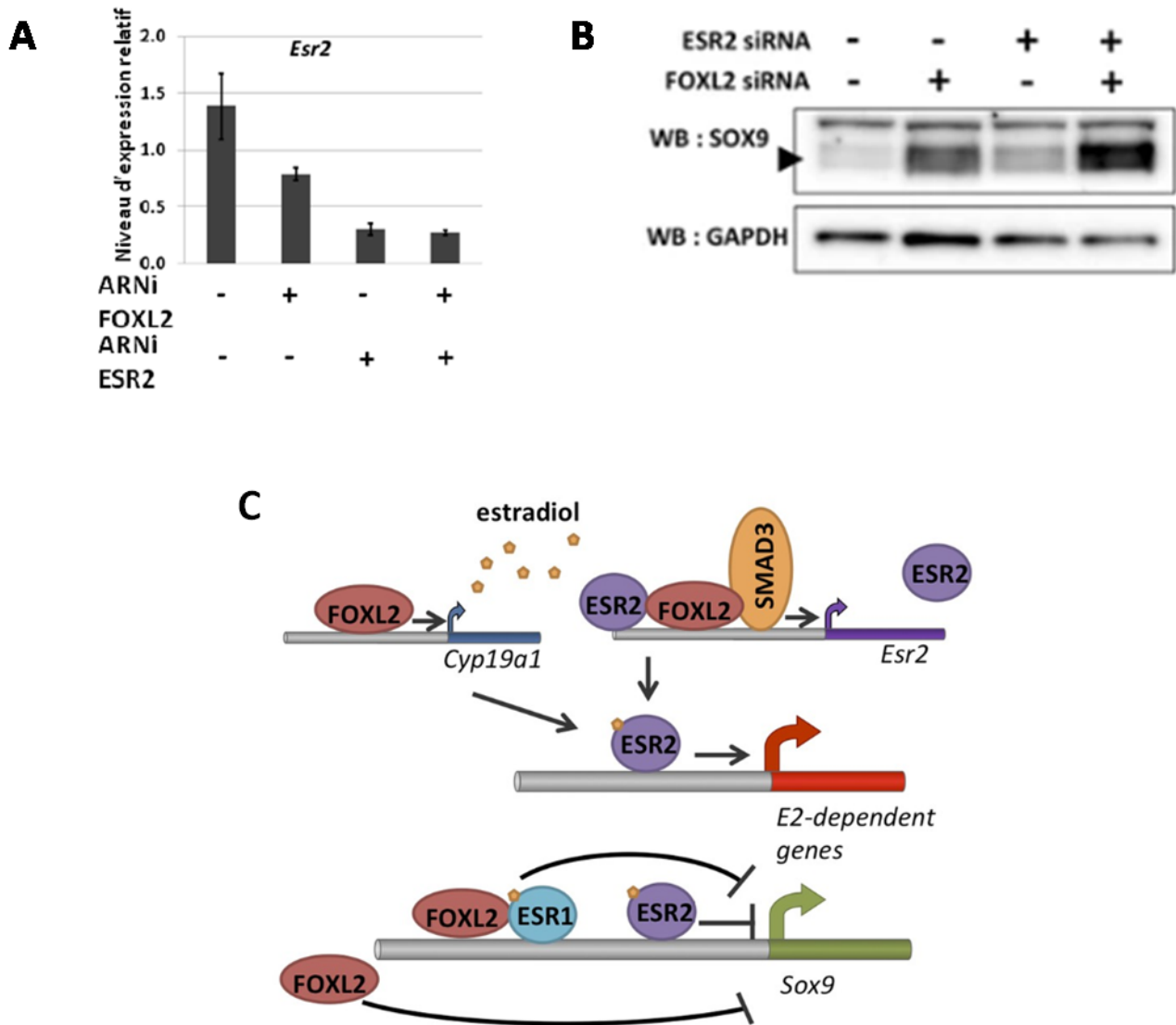


Figure 20 : Foxl2 et Esr2 inhibent l'expression de Sox9 dans les cellules de la granulosa murine.

A. Effets direct et indirect des KD de Foxl2 et Esr2 par ARN interférents sur l'expression de Foxl2 et d'Esr2. Une baisse d'Esr2 est observée lorsque les cellules sont traitées avec un ARNi ciblant Foxl2 suggérant une régulation d'Esr2 par Foxl2.

B. Western blot de l'expression de Sox9 et de la Gapdh dans des cellules de la granulosa extraites de follicules murins traitées par siRNA anti-Foxl2 et/ou anti-Esr2 pendant 48 heures. La flèche noire désigne Sox9.

C. Représentation schématique de la régulation par Foxl2 de l'expression de l'oestradiol, d'Esr2 puis de la répression de l'expression de Sox9. Les résultats suggèrent que FOXL2 pourrait réguler la signalisation de l'oestradiol par (i) la régulation de la production de E2 et (ii) la régulation de la réceptivité aux oestrogènes en modulant l'expression de Esr2. Foxl2 coopère avec Activin/Smad3 et éventuellement avec Esr2 lui-même dans ce processus. La répression de Sox9 semble reposer sur de multiples voies en plus de celle décrite ici, puisque Foxl2 et Esr1 ont été décrits comme co-liant un élément régulateur de Sox9 dans l'ovaire.

i. Analyse transcriptomique

La principale étude transcriptomique de l'effet de FOXL2 a été réalisée dans notre laboratoire et publiée en 2014 (118). Elle a été réalisée sur des cellules de la granulosa récupérée à partir de follicules pré-antraux issus d'ovaire de souris de 8 semaines. Après 8 jours de culture, les cellules ont été traitées avec par siRNA ciblant *Foxl2* (ou siRNA contrôle). L'un des premiers effets observés de ce KD est une réduction d'environ 50% de la quantité du messager d'*Esr2* (Figure 20A) suggérant qu'*Esr2* est une cible transcriptionnelle de FOXL2. Suite au KD, les ADNc ont été quantifiés sur des puces à ADN comportant des sondes pour 44 000 transcrits murins. Ce KD de *Foxl2* a mené à l'identification de 691 gènes cibles, dont 239 réprimés (activé par FOXL2) et 452 activés. De façon attendue, les cibles de FOXL2 sont enrichies en gènes exprimés dans l'ovaire. Les enrichissements les plus significatifs ont été trouvés parmi les cibles activées par FOXL2 (239 gènes), avec comme processus biologiques identifiés « communication cellulaire », « régulation de la différenciation cellulaire » et « développement de structure anatomique ». Les phénotypes les plus enrichis sont « physiologie anormale du système reproductif femelle », « morphologie anormale des vaisseaux sanguins » et « morphologie anormale du segment postérieur de l'œil ».

L'étude portait principalement sur le rôle de FOXL2 en parallèle avec certains récepteurs nucléaires. En effet de nombreux partenaires de FOXL2 font partie de cette catégorie de FT. Le but était de déterminer si FOXL2 jouait un rôle dans la détermination des cibles régulées par les récepteurs nucléaires. Une analyse du KD de FOXL2 et de ses partenaires par transcriptomique a montré que la présence de FOXL2 est nécessaire à la régulation par NR2C1, ESR1, ESR2 et AR de plus de la moitié de leur cible, FOXL2 apparaissant alors comme un régulateur majeur de la réponse aux stéroïdes dans les cellules de la granulosa. Particulièrement, la perte de *Foxl2* et *Esr2* a été associée à une augmentation de l'expression de *Sox9* dans les cellules de la granulosa, suggérant qu'une répression synergique de son expression par FOXL2 et ESR2 existait (Figure 20B et C).

ii. Fixation de FOXL2

Au cours de la même étude, l'immunoprécipitation de la chromatine associée à FOXL2 a été réalisée puis envoyée à séquencer pour identifier à l'échelle du génome les sites reconnus par FOXL2. Le principal motif identifié dans les séquences reconnues par FOXL2 est un motif très semblable au motif classique des FT à domaine forkhead. Un motif secondaire assez proche du motif *FKH* a également été identifié dans ces pics. Dans cette étude sur 13 000 pics identifiés, environ 1 000 pics ont été trouvés à moins de 1 000 bases de sites d'initiation de la transcription. Étonnamment, il n'existe pourtant aucune corrélation entre la présence d'une séquence reconnue par FOXL2 et l'effet transcriptionnel que pourrait avoir FOXL2 sur le gène à proximité.

iii. Partenaires

FOXL2 a été décrit comme pouvant former des multimères mais contrairement aux autres facteurs *FKH* rien ne montre que cette forme est active transcriptionnellement. De plus les sites de fixation identifiés jusqu'alors suggèrent plutôt une liaison à l'ADN en monomère (274). En revanche, il a été montré que FOXL2 interagissait avec le facteur pro-apoptotique DEADbox-hélicase DDX20 et que leurs surexpressions simultanées dans des cellules de la granulosa conduisent à une diminution de la viabilité cellulaire même si aucune cible commune n'a été identifiée.

Comme pour d'autres facteurs *FKH*, FOXL2 peut interagir avec SMAD3, un des effecteurs de la voie TGF β (275). Dans l'hypophyse, plusieurs gènes ont été montrés comme étant co-régulés par FOXL2 et SMAD3 dont *Gnrh*, *Fsh*, *Fshb* (275–277). Dans l'ovaire, l'interaction entre FOXL2 et SMAD3 a été montrée dans une lignée de cellules humaine (278) mais l'effet de ce couple sur la régulation de la transcription dans l'ovaire reste inconnu.

Enfin FOXL2 interagit directement avec plusieurs récepteurs nucléaires, connus pour jouer un rôle dans le développement mais aussi dans la fonction ovarienne. Parmi eux, on retrouve ESR1 et ESR2, les récepteurs nucléaires orphelins NR5A1 et NR5A2 et le récepteur à la progestérone PGR (118). Comme discuté précédemment, cette interaction avec les récepteurs nucléaires est partagée avec les autres facteurs à domaine *FKH*, suggérant une interaction conservée entre ces deux familles (71).

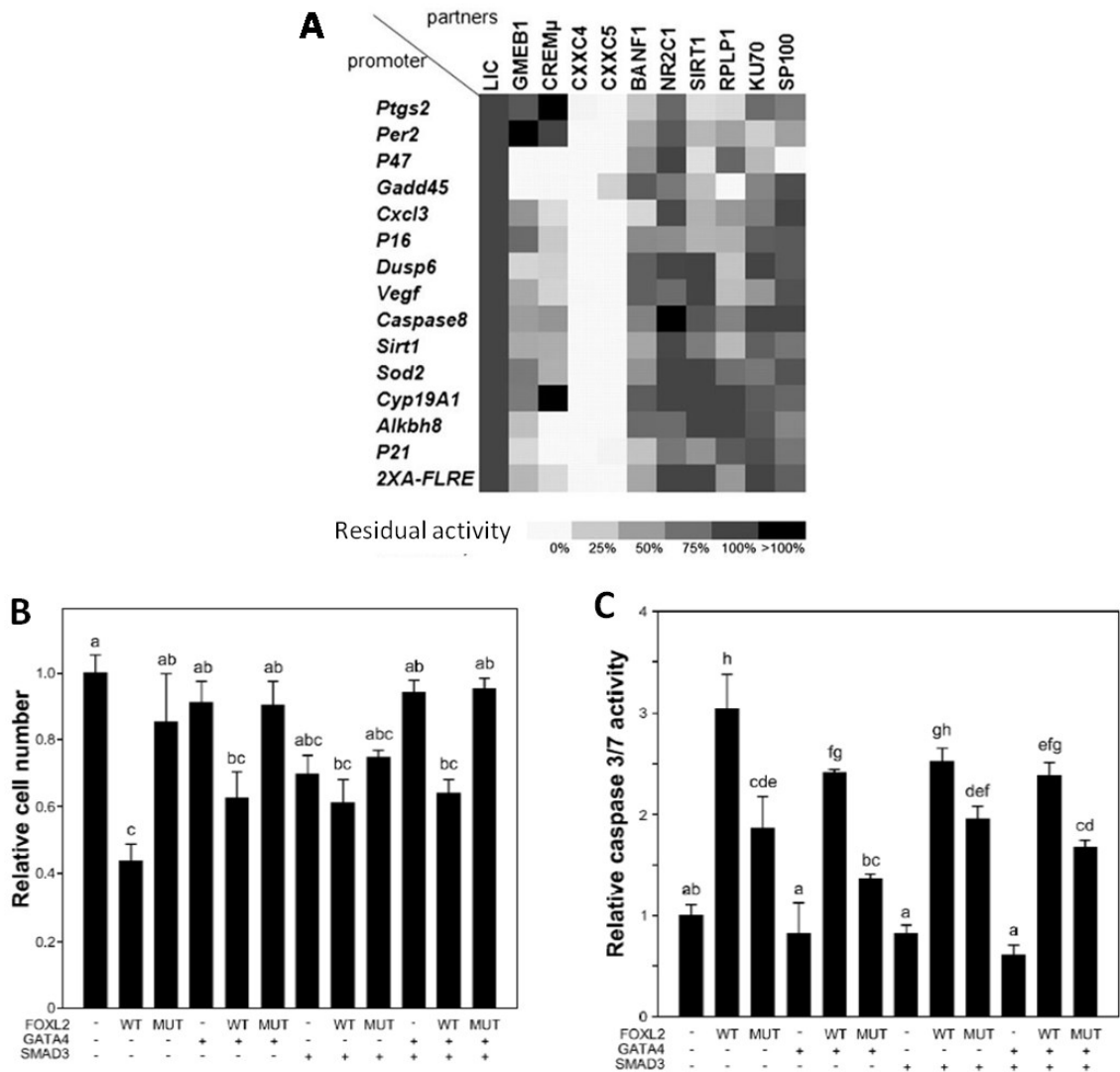


Figure 21 : Effet des partenaires de FOXL2 sur la régulation des cibles transcriptionnelles de FOXL2, sur l'apoptose et sur la prolifération des cellules de la granulosa (adaptée de l'Hôte et al. 2011 et George et al. 2013).

A. Modulation de la transactivation de FOXL2 par ses partenaires sur un panel de promoteurs cibles. Des cellules KGN ont été transfectées avec des rapporteurs luciférase possédant différents promoteurs en amont, un contrôle exprimant la renilla, FOXL2 (ou NLS) et les partenaires de FOXL2 (ou non, LIC). La réponse transcriptionnelle de 15 promoteurs, connus pour être cibles de FOXL2, a été testée. La Heatmap présente la modulation de l'activité transcriptionnelle des promoteurs en présence de FOXL2 et son partenaire sur chaque promoteur. Chaque carré présente un ratio de l'activité de la luciférase avec l'expression de FOXL2 ou sans l'expression de FOXL2 (en 4 réplicats). L'échelle va du blanc au noir et la couleur est proportionnelle à l'activation par FOXL2 et son partenaire normalisée par l'activation de FOXL2 seul. De ce fait, les carrés gris foncés pour FOXL2 + LIC représentent l'activation "normale" de la transcription (100%). Les couleurs plus claires représentent une baisse de l'activité du promoteur alors que les couleurs plus foncées représentent une hausse de l'activité.

B. Effet de FOXL2, SMAD3 et GATA4 sur la survie cellulaire de cellules de la granulosa humaine. La viabilité cellulaire a été mesurée 48h après la transfection de FOXL2 et de ses partenaires (trois expériences indépendantes avec des triplicats).

C. Effet de FOXL2, SMAD3 et GATA sur l'apoptose de cellules de la granulosa humaine. L'activité de la caspase 3/7 est mesurée 24 heures après transfection de FOXL2 et ses partenaires (trois expériences en triplicats).

Au laboratoire, 11 partenaires de FOXL2 ont été identifiés par double hybride en levure ou par approche gène candidat. Parmi les 9 identifiés par crible double-hybride en levure d'une banque d'ADN complémentaire ovariens, 8 protéines déjà décrites sont impliquées dans la régulation transcriptionnelle : 2 FTs (CREM et NR2C1), un co-activateur (GMEB1), deux régulateurs de la voie TGF β (CXXC4 et CXXC5), un structurateur chromatinien (BANF1), un acteur de la réparation de l'ADN (KU70) et une protéine constitutive des corps à PML (SP100). L'étude a également permis de confirmer l'interaction entre FOXL2 et SIRT1. La caractérisation de ces partenaires dans la régulation transcriptionnelle des cibles de FOXL2 a été réalisée sur 15 promoteurs rapporteurs. Ainsi, CXXC4, CXXC5 et BANF1 présentent un effet répresseur de l'activité transcriptionnelle de FOXL2. Alors que SIRT1, GMEB1 et CREM ont des effets variables suivants les promoteurs avec un aspect plutôt répresseur. Enfin NR2C1 et SP100 ont peu d'effets sur la plupart des promoteurs (Figure 21A)(279).

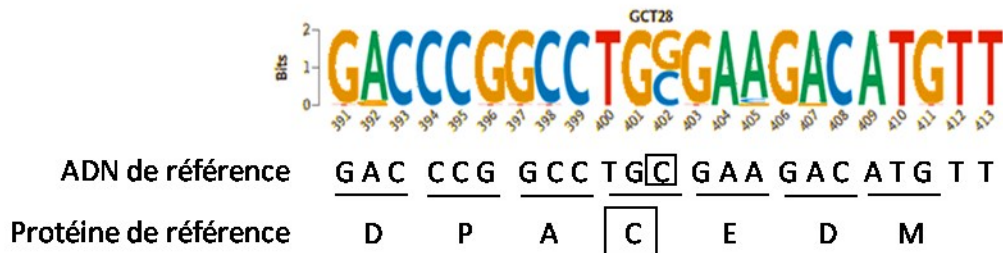
Enfin une collaboration, avec une équipe finlandaise, a permis de mettre en évidence la présence d'une interaction directe entre FOXL2 et le FT GATA4. Dans cette étude, l'interaction entre FOXL2, GATA4 et SMAD3 a été associée à un rôle anti-apoptotique et pro-prolifératif dans les cellules de la granulosa (Figure 21B et 21C).

De façon intéressante plusieurs partenaires présentent des caractéristiques communes avec les rôles de FOXL2. En effet, nous l'avons abordé précédemment les KD de *Smad3* et d'*Esr1/Esr2* donnent respectivement, dans les cellules de la granulosa, des phénotypes très similaires à ceux obtenus avec le KD de *Foxl2*. L'étude de ses partenaires dans les cellules de la granulosa et leurs effets dans ces cellules en interaction avec *Foxl2* présentent un intérêt majeur dans la compréhension des mécanismes mis en place dans la différenciation des cellules de la granulosa et le maintien de leur identité.

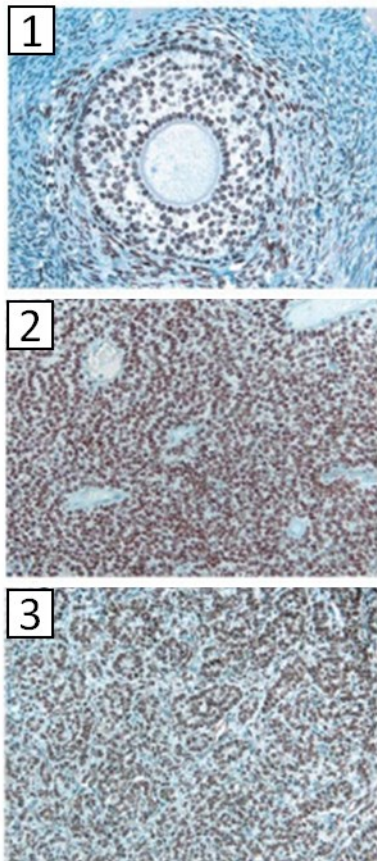
3. FOXL2 et la forme adulte du cancer des cellules de la granulosa

Les tumeurs des cellules de la granulosa adultes appartiennent aux tumeurs du cordon sexuel de l'ovaire et représentent 2-5% des malignités ovariennes avec une incidence estimée à 0,6-1,0 pour 100 000 femmes par an dans le monde entier. Le cancer de l'ovaire est la 5e cause de mortalité chez les femmes (187) mais si le cancer est diagnostiqué avant le stade métastatique, la survie à 5 ans dépasse 90%. Malheureusement, plus de 70% de ces cancers sont diagnostiqués tardivement, et la survie à 5 ans de ces patientes est de seulement 30% (187).

A



B



C

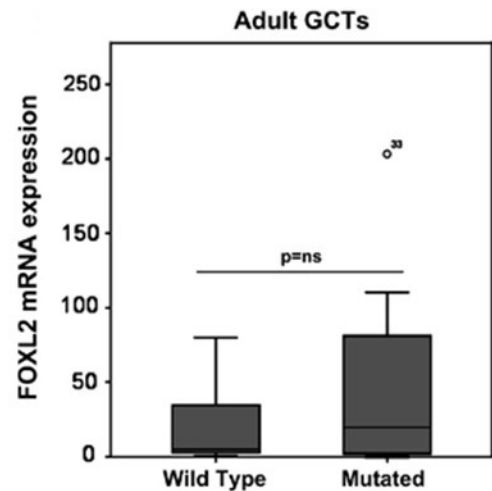


Figure 22 : Caractérisation de la mutation p.C134W de FOXL2 dans les tumeurs adultes des cellules de la granulosa (adaptée de Shah et al., 2009 et D'Angelo et al., 2011).

A. Représentation en logo de la séquence de FOXL2 dans les AGCTs séquencées par Shah et al. Une mesure de 2 bits représente une base détectée à l'état homozygote. Le variant 402C->G est visible dans le logo. L'ADNc de référence et la séquence de la protéine sauvage sont présentées sous le logo avec les résidus mutés en encadré noir.

B. Immunohistochimie de FOXL2 dans des cellules de la granulosa saine (1), dans une AGCT hétérozygote (2) et une hémizygote ou homozygote (3) pour la mutation p.C134W. L'immunohistochimie montre que FOXL2 est exprimé dans les noyaux des cellules de la granulosa saine aussi bien que dans les cellules issues d'AGCTs. Le marquage est normal dans les tumeurs et la mutation ne semble pas affecter la localisation de la protéine FOXL2 au noyau.

C. Niveau d'expression de l'allèle FOXL2 et de l'allèle FOXL2-C134W dans des AGCTs. Les deux ARNm sont détectés au même niveau d'expression sans différence significative.

Dans certain cas d'AGCT, les patientes peuvent développer des symptômes, tels que des saignements vaginaux, causés par une exposition prolongée à des œstrogènes provenant de la tumeur, permettant une détection précoce de la maladie. Toutefois, les AGCTs ne sont généralement pas suspectées avant l'opération et un diagnostic histopathologique est posé après une ablation chirurgicale d'une masse ovarienne. Les AGCTs sont définies histologiquement par des noyaux rainurés, uniformes et pâles et une variété et un mélange de motifs microfolliculaires, trabéculaires, insulaires et diffus (280). Bien que la maladie soit fréquemment décrite comme indolente, des récurrences se produisent dans environ 50% des cas, et 50 à 80 % des malades finissent par en mourir (281). Les récurrences nécessitent souvent des opérations répétées puisque les options de traitements alternatifs, y compris la chimiothérapie, la radiothérapie et l'hormonothérapie n'ont jusqu'à présent montré qu'un effet limité (282). L'absence actuelle de traitement systémique efficace met l'accent sur la nécessité de nouvelles stratégies thérapeutiques. La caractérisation moléculaire des AGCTs pourrait aider à identifier des cibles potentielles de traitement.

En 2009, le séquençage à haut débit de transcriptome d'AGCT a révélé l'existence d'une mutation faux-sens somatique récurrente de FOXL2 dans plus de 95% des tumeurs étudiées. Cette mutation conduit à la substitution de la Cystéine 134 de FOXL2 par un résidu Tryptophane (c.402C>G ; p.C134W), et est le plus souvent observée à l'état hétérozygote dans l'ADN génomique tumoral (283) (Figure 22A).

Des expériences d'immunohistochimie ont montré que la protéine FOXL2 mutée est exprimée et localisée au noyau dans les cellules tumorales (283) (Figure 22B). Des études de séquençage ultérieures de FOXL2 dans des panels de tumeurs provenant de divers tissus ont révélé que cette mutation n'est trouvée que dans les AGCTs (284–286). L'allèle muté de FOXL2 est aussi détecté en pyroséquençage, suggérant que cette mutation n'affecte ni la transcription ni la stabilité de l'ARN (287) (Figure 22C).

La fréquence très élevée de la mutation, ainsi que sa spécificité, suggère qu'elle pourrait être à l'origine de la transformation tumorale dans la granulosa adulte.

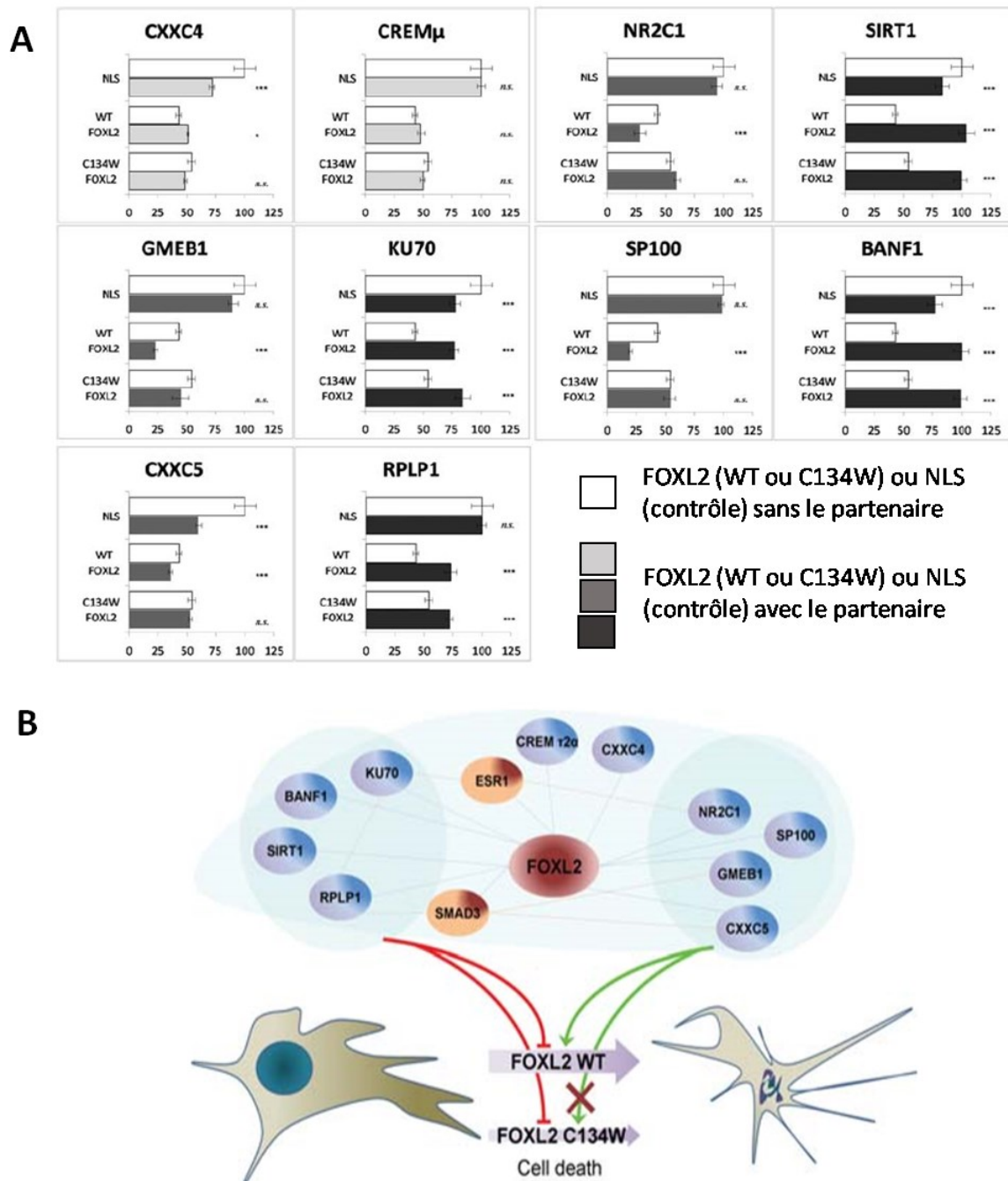


Figure 23 : **FOXL2 et ses partenaires régulent de façon différentielle la fonction pro-apoptotique suivant que la protéine FOXL2 soit sauvage ou mutante (C134W) (adaptée de L'Hôte et al., 2011).**

A. Modulation de l'apoptose induite par FOXL2 et ses partenaires. Des cellules KGN ont été transfectées avec FOXL2-WT-V5, FOXL2-C134W-V5 ou NLS-V5 et leurs partenaires (ou vecteur contrôle). La viabilité cellulaire a été mesurée par activité β -gal et est mis en lien avec l'apoptose. Le nombre de cellules exprimant la β -gal est mesuré 24 heures après la transfection. Les données sont issues de deux expériences indépendantes réalisées en triplicat et le contrôle NLS est normalisé à 100% de survie. Un test de Student permet de mesurer la significativité de chaque condition par rapport à la même condition sans partenaire transfecté. n.s., non-significatif. * $p < 0.05$. *** $p < 0.001$.

B. Représentation schématique de la modulation de l'apoptose par FOXL2-WT ou FOXL2-C134W et leurs différents partenaires. En marron, partenaires déjà connus de FOXL2 et en bleu, les partenaires nouvellement identifiés par Georges et al.. Les lignes entre les partenaires représentent les interactions.

Les effets moléculaires associés à la mutation C134W sont pour le moment inconnus mais des études ont été réalisées notamment sur la relation entre FOXL2 et ses partenaires. De manière intéressante, il a été remarqué que l'effet hyperactivateur de GMEB1 et CREM sur l'activation par FOXL2 de promoteurs cibles est modifié par l'utilisation de la version mutante p.C134W de FOXL2. L'hyperactivation par le mutant est perdue avec CREM, et augmentée avec GMEB1. Il a également été observé que FOXL2 pouvait induire l'apoptose en synergie avec certains de ses partenaires (NR2C1, GMEB1 et SP100) mais que cette synergie n'a pas lieu avec le mutant pro-oncogénique de FOXL2 (p.C134W), qui présente un défaut d'induction de l'apoptose. La mutation pourrait alors empêcher l'intégration de différents signaux pro-apoptotiques. Cependant, les mécanismes restent peu clairs et la capacité de FOXL2-C134W à interagir avec ses partenaires non étudiés (278) (Figure 23A et B).

L'effet de FOXL2, GATA4 et SMAD3 a été testé sur deux promoteurs rapporteurs mais n'a pas permis de mettre en évidence de différence flagrante entre FOXL2-WT et FOXL2-C134W vis-à-vis de GATA4 et SMAD3. En revanche FOXL2 semble avoir un rôle antagoniste à GATA4 et SMAD3 vis-à-vis de gènes impliqués dans la prolifération et l'apoptose. La mutation C134W pourrait donc entraîner une perte de cet antagonisme. Cependant, l'examen précis de FOXL2 p.C134W et de ses effets dans la cellule restent nécessaire pour comprendre le processus associé à la tumorigénèse.

Des études précédentes sur les altérations génomiques des AGCTs ont identifié des gains de nombre de copies dans les chromosomes 12 et 14 et une perte du chromosome 22 (288–290). En outre, des études incluant un sous-ensemble d'AGCTs dans une cohorte plus large de cancers de l'ovaire ont permis de détecter des mutations dans des gènes connus pour leur implication dans d'autres cancers tels que TERT, KMT2D, PIK3CA, AKT1, CTNNB1 et NR1D1 (289–291). Une récente étude publiée en 2020 (292), présente la plus grande cohorte d'AGCT caractérisée moléculairement à ce jour, sur laquelle un séquençage du génome entier (WGS) a été réalisé. Cette méthode leur permet d'étudier les changements en nombre de copies, les gènes souvent mutés, les signatures mutationnelles et l'hétérogénéité des tumeurs. Ils ont défini un sous-groupe de patients présentant des AGCTs à un stade avancé et possédant une mutation TP53 pathogène. En outre, ils identifient des mutations potentiellement « drivers » dans les AGCTs sans la mutation FOXL2 c.402C>G (4 patients sur 33), et trouvent plus de variants dans les AGCTs avec récurrences par rapport aux tumeurs primaires. Enfin, ils détectent un degré élevé d'hétérogénéité dans les tumeurs entre patientes. De façon intéressante dans leur étude, 2 patientes présentent une seconde mutation dans FOXL2 qui provoque un décalage du cadre de lecture et un variant dans la région 5'UTR.

La mutation FOXL2 p.C134W est maintenant décrite dans un grand nombre d'AGCTs mais sa caractérisation moléculaire reste très superficielle. Ce manque se traduit principalement par une absence de modèles cellulaires facilement exploitables mais cette étude reste nécessaire à la compréhension de l'étiologie des tumeurs et à la mise en place de traitement efficace.

3. Projet doctoral

La régulation de la transcription pose de nombreuses questions auxquelles les techniques à haut débit tentent de répondre. Parmi ces questions la reconnaissance d'éléments régulateurs spécifiques par les FTs et l'interprétation de cette fixation pose un problème majeur. En effet un FT possède une multitude de site de fixation possible alors que le FT ne reconnait que certains éléments régulateurs. Ensuite deux questions restent en suspens : comment cette fixation est interprétée par la cellule d'un point de vue transcriptionnel ? Et qu'est ce que cela entraîne pour le devenir de la cellule et sa fonction ?

L'objectif principal de mon travail de thèse est double et tente d'apporter des réponses à la régulation de la transcription par les FTs. Dans un premier temps, j'ai utilisé des approches non-supervisées à haut débit (RNA-seq et ChIP-seq) pour étudier le couple FOXL2/ESR2 et leur impact, seul ou ensemble, sur la régulation de gènes cibles dans les cellules de la granulosa. Ce travail a été réalisé dans des cellules folliculaires primaires murines en utilisant une approche de knockdown (KD) par siRNA. Les différentes informations générées ont permis de mieux comprendre comment le FT FOXL2 interagit avec ESR2 pour reconnaître des sites spécifiques. Ces résultats feront l'objet d'une publication très prochainement, présentée ci-après en [article 1](#). En parallèle d'ESR2, d'autres partenaires de FOXL2 ont été étudiés, SMAD3 et TRIM28, avec les mêmes approches dans le cadre d'une collaboration. Les résultats en cours d'analyse seront présentés à la suite de l'article 1 et publiés ultérieurement.

Dans le cadre du premier projet j'ai aussi activement participé à la publication de [l'article 2](#), dans lequel l'équipe a identifié des nouveaux partenaires de FOXL2, *via* une approche de co-immunoprécipitation associée à de la protéomique dans des cellules de la granulosa murine (AT29C) et dans cellules dérivées de la glande pituitaire (α T3). Après une analyse des données de spectrométrie de masse, l'équipe a identifié un ensemble de 255 partenaires de FOXL2 communs aux deux lignées cellulaires. Leur analyse a montré que nous étions capables de co-précipiter plusieurs complexes impliqués dans le traitement de l'ARNm, le remodelage de la chromatine et la réplication et la réparation de l'ADN. Les interactions (directes et/ou indirectes) ont ensuite été validées par Western Blot avec des partenaires suggérant un rôle inattendu pour FOXL2 dans ces processus. Dans l'ensemble, cette analyse exhaustive de l'interactome FOXL2 endogène met en lumière ses nombreux et divers interacteurs et les rôles cellulaires non conventionnels.

Le second projet, toujours en cours, cherche à caractériser les cibles de FOXL2 C134W, variant unique et pathogénique identifié dans la grande majorité des tumeurs adultes des cellules de granulosa. Les objectifs de cette étude sont multiples : générer *via* la technologie CRISPR/Cas9 des cellules de la granulosa pour l'étude de la mutation et caractériser les cibles directes de FOXL2 par analyses hauts-débit. Des cellules portant la mutation à l'état hémizygote et des lignées contrôles WT pour FOXL2 ont été obtenues et leurs transcriptomes ont été séquencés. Les résultats concernant ce projet sont encore trop préliminaires pour faire l'objet d'une publication rapidement.

Enfin en annexe sera présenté l'article 3 qui est l'objet d'une collaboration avec la post-doctorante de l'équipe et qui a plus attiré à AKT et son rôle dans les tumeurs de la granulosa juvénile. Le projet étant un peu éloigné du projet de thèse il ne fait pas partie intégrante du manuscrit mais peut néanmoins apporter des pistes intéressantes notamment dans les mécanismes qui régulent la migration des cellules de la granulosa. Une partie des résultats concernant AKT seront d'ailleurs discutés dans la partie II.1.A.1.3).

II. Résultats

1. FOXL2 et ses partenaires transcriptionnels dans les cellules de la granulosa

A. FOXL2 et ses partenaires dans la fonction de l'ovaire

1.Introduction

Nous l'avons vu, les FT ne fonctionnent pas de manière isolée mais en interaction avec d'autres FT et de multiples voies de signalisation. Dans le cadre de l'étude de FOXL2, plusieurs partenaires protéiques ont été identifiés au laboratoire et ont été décrits dans l'introduction de ce manuscrit. Cependant, les cibles transcriptionnelles communes de FOXL2 et de ses partenaires ne sont que très peu connues. Parmi les partenaires identifiés, ESR1 et ESR2 sont des cibles de choix à étudier car un phénotype similaire au KD de *Foxl2* est retrouvé dans des souris où ces deux récepteurs ont été inactivés (197, 293). Il serait donc intéressant de déterminer si une interaction directe avec ces facteurs est nécessaire à la détermination par FOXL2 de leurs cibles transcriptionnelles. ESR1 étant très peu exprimé dans les cellules de la granulosa nous avons fait le choix de n'étudier qu'ESR2. Le but de l'étude étant de comprendre si une interaction protéine-protéine entre FOXL2 et ESR2 favorise le recrutement de ce couple au niveau de certaines cibles génomique, à définir.

Nous avons ainsi réalisé le KD de *Foxl2* ou *Esr2* dans les cellules primaires de la granulosa murine afin d'évaluer les conséquences moléculaires de leur absence sur leur capacité à se lier à la chromatine et à moduler l'expression des gènes. Nous avons constaté que FOXL2 et ESR2 modulent un nombre important de cibles communes. Il est intéressant de noter que nous avons identifié plusieurs sites de liaison de FOXL2 qui ne sont pas reconnus par FOXL2 lorsqu'ESR2 est absent. Afin d'identifier les effets directs de la fixation de FOXL2 et/ou ESR2 sur la régulation de la transcription, nous avons analysé en parallèle nos données de RNA-seq et de ChIP-seq en se concentrant sur les événements ayant lieu dans le même domaine d'association topologique. En effet, il est souvent difficile de relier fixation d'un FT et action sur la régulation car les FT peuvent se fixer à très grandes

distances des gènes rendant l'analyse plus complexe. Nous avons ainsi identifié une quinzaine de sites de liaisons localisés à proximité de gènes impliqués dans la migration et l'adhésion cellulaire. Nous montrons également que FOXL2 et ESR2 modulent ensemble la capacité de la cellule à migrer et à envahir *via* notamment leur régulation de l'expression de *Phactr1*. Plus précisément, les cellules de la granulosa en absence de *Foxl2* et *Esr2* présentent une diminution de la vitesse de migration et de la capacité d'invasion cellulaire, similaire au phénotype observé en absence de *Phactr1* lui-même.

De plus notre analyse des cibles transcriptionnelles de FOXL2 mettent en évidence l'existence d'un lien fonctionnel entre AKT/FOXL2 et la migration cellulaire pouvant apporter des nouvelles pistes sur les événements moléculaires à l'origine de la tumorigenèse due aux mutations AKT et FOXL2 dans les JGCTs et les AGCTs. Tous nos résultats fournissent de nouvelles voies de régulation associées à FOXL2 mais aussi à son partenaire ESR2, améliorant notre compréhension du rôle de FOXL2 dans les cellules de la granulosa.

2. Article 1 : A genome-wide exploration of the targets of the transcription factors FOXL2 and ESR2 unveils their implication in cell migration, invasion and adhesion.

Laetitia Herman, Bérange Legois, Anne-Laure Todeschini*, Reiner A. Veitia*.

A genome-wide exploration of the targets of the transcription factors FOXL2 and ESR2 unveils their implication in cell migration, invasion and adhesion.

Laetitia Herman^{1,2}, BérangèreLegois^{1,2}, Anne-Laure Todeschini^{1,2*}, Reiner A. Veitia^{1,2,3*}.

* co last authors

¹ Université de Paris, F-75006, Paris, France.

² Université de Paris, CNRS, Institut Jacques Monod, F-75006, Paris, France.

³ Université Paris-Saclay, Institut de Biologie F. Jacob, Commissariat à l'Energie Atomique, Fontenay aux Roses, France.

Abstract

The forkhead box L2 (FOXL2) and the estrogen receptor beta (ESR2) are key transcriptional regulators in ovarian granulosa cells. As little is known about the transcriptional roles of FOXL2 and its partner ESR2, we have depleted *Foxl2* and *Esr2* in mouse primary granulosa cells to assess the molecular consequences of this intervention on their ability to bind their targets and to modulate gene expression. We show that FOXL2 is involved in a large number of regulatory actions essential for the maintenance of granulosa cells fate cell. We provide evidence showing that FOXL2 and ESR2 modulate, through a coherent feed-forward loop, an important number of common targets. Indeed, we have identified several binding sites of FOXL2 that are not recognized when ESR2 is depleted. Moreover, a large number of these binding sites are localized in the vicinity of genes involved in cell migration and adhesion. Consistently, we show that both FOXL2 and ESR2 modulate together the cell's ability to migrate and invade *via* their co-regulation of *Phactr1* expression. Specifically, we show that granulosa cells depleted for either *Foxl2* and *Esr2* exhibit decreased migration velocity and cell invasion ability and this is paralleled by the depletion of *Phactr1* itself. We provide also a functional link between AKT and FOXL2 on a specific pool of genes where AKT inhibits FOXL2 activity. Our results taken all together point to novel pathways regulated by FOXL2 and its partner ESR2 shedding a new light on the role of both transcription factors in granulosa cells.

Introduction

FOXL2 is a highly conserved gene encoding a forkhead transcription factor (TF) required for the differentiation and maintenance of granulosa cells, those surrounding the oocyte in ovarian follicles (1–3). *Foxl2*^{-/-} mice are devoid of mature granulosa cells (2) and depletion of *Foxl2* in mature granulosa cells results in their “molecular” transdifferentiation involving an upregulation of markers of Sertoli cells, the somatic cells of the male sex cords (3). In humans, heterozygous mutations of *FOXL2* underlie the blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome (BPES), where an eyelid hypoplasia can be associated or not with premature ovarian insufficiency (POI)(4). *FOXL2* pathogenic variants impairing its DNA-binding and/or transcriptional activity are responsible for cases of BPES with POI (5, 6). Furthermore, a unique damaging variant of *FOXL2* (*FOXL2* c.402C>G, C134W at the protein level) has been identified in the vast majority of adult-type granulosa cell tumors (AGCTs), showing the important role of *FOXL2* for granulosa cell fate and function (7).

Several proteins that interact with *FOXL2* have been identified by ourselves and others, including DEAD box-containing protein DP103 and TFs such as the estrogen receptor *ESR1* (encoding estrogen receptor alpha), the orphan nuclear receptor SF-1 and *SMAD3*(8). Interestingly, mice depleted for both estrogen receptors (*Esr1* and *Esr2*) display a transdifferentiation of granulosa cells similar to that observed when *Foxl2* is depleted in mature cells (9). Moreover, previous data from our group, show that *FOXL2* and *ESR2*/Estrogen (E2) repress the expression of the testis determining factor *SOX9* in ovarian follicular cells (1). Despite such progresses, the mechanisms by which *FOXL2* and its partners regulate granulosa cell differentiation are not well understood. This is due, at least in part, to the difficulty in the isolation of primary granulosa cells at different maturation stages and to the fact that the deletion/depletion of *Foxl2* triggers a rapid transdifferentiation of such cells into Sertoli-like cells as pointed out above (3). Moreover, cellular models, such as GCT-derived cell lines or ovaries from constitutive knocked-out mice are far from being satisfactory (because of aforementioned transdifferentiation issue) and cannot thus provide a *bona fide* overview of *FOXL2* transcriptional targets.

In contrast to AGCTs, juvenile GCTs (J-CGTs) are less well-characterized in molecular terms. *FOXL2* has been found under-expressed in such tumors (10) and more recently, we identified pathogenic variants affecting *AKT1* as their main molecular hallmark. Indeed, we found that more than 60% of the tumor samples studied bore somatic in-frame tandem duplications affecting the pleckstrin homology domain (PHD) of *AKT1* whereas the others carried potentially damaging point mutations at conserved residues (11). To date, no link has been made between these two different GCT types and a potential (dys)regulation of *FOXL2* expression or function by *AKT*.

Here, we explore target gene regulation by FOXL2 and ESR2 on genome-wide scale. Specifically, this work was performed using murine primary follicular cells through a knockdown (KD) approach coupled to RNA-sequencing (RNA-seq) and ChIP-seq. These analyses allowed us to uncover a thorough core of FOXL2 and ESR2 transcriptional targets in the somatic cells of preantral-follicles, which includes as expected many key genes of ovarian function. A ChIP-seq analysis of FOXL2 in these cells suggests that it mainly binds to regions located in intergenic regions quite far from its targets, and provides a resource of potential regulatory elements. RNA-seq allowed us to find multiple common cellular processes altered by the depletion of either *Foxl2* or *Esr2*, notably those regarding cell migration and the regulation of extracellular matrix (ECM) organization. Moreover, we show that FOXL2 and ESR2 are required, for normal expression of *Phactr1* (Phosphatase and actin regulator 1). *Phactr1* is an interactor of the protein phosphatase 1 (PP1), of which it modulates the activity, and of G-actin (12, 13). The regulation of its expression by FOXL2 and ESR2, through a newly identified regulatory element, is required for efficient granulosa cell migration, invasion and adhesion. We also document an interesting functional interaction between FOXL2 and PI3K/AKT, also describe to drive cell migration and invasion, regulating the actin cytoskeleton (14, 15) and the secretion of matrix metalloproteases (16).

Taken together, our transcriptomic and genome-wide location data help understand the role of both FOXL2 and ESR2 in the biology of ovarian granulosa cells.

Results

New insights on the transcriptomic effects of the depletion of *Foxl2* in mouse primary granulosa cells

In order to investigate the transcriptional targets of FOXL2 in mouse primary granulosa cells (pGCs), we silenced *Foxl2* using RNA interference for 30 hours, as previously reported (1), and for 54 hours in order to assess cascading (indirect) regulatory events. RT-qPCR and Western Blot analysis (Figures 1A and 1B) confirmed that depletion was greater than 80% at the transcript level and of about 70 % at the protein level. Next, we performed RNA-seq for pGCs depleted for *Foxl2* (n=6) and for those treated with the control (scramble) siRNA (n=6). In our subsequent analyses, we focused on statistically significant differentially expressed (DE) mRNAs having \log_2 Fold Changes (Log2FC) ≥ 0.585 or ≤ -0.585 , which correspond to Fold Changes ≥ 1.5 in either direction. We identified 531 down-regulated and 567 up-regulated genes upon *Foxl2* KD for 30 hours (Supp. Table 1) (i.e., directly or indirectly activated or repressed by FOXL2, respectively) and 1217 down-regulated and 1567 up-regulated genes upon *Foxl2* KD for 54 hours (Supp. Table 2) (Figure 1C). First, we focused our analysis on the DE targets common to both KD conditions, that is, 476 genes up-regulated and 525 down-regulated by FOXL2, including most of genes affected in the 30h KD condition (Figures 1D and 1E). All these genes were dysregulated in the same direction in the two KD conditions, with a stronger effect when the KD took place for 54 hours (Figures 1E and 1F). KEGG pathway analysis (17) of the common DE genes identified several pathways detailed in Table 1 (and Supp. Table 3) and notably related to ECM-receptor interaction (adjusted p-value: $p_{\text{adj.}} < 0.0001$), focal adhesion ($p_{\text{adj.}} < 0.0001$), regulation of actin-cytoskeleton ($p_{\text{adj.}} < 0.006$) and PI3K-Akt signaling ($p_{\text{adj.}} < 0.0001$).

Table 1: FOXL2-dependent cellular processes.

Gene lists (FOXL2 targets) were analysed using KEGG (in red) and REACTOME (in blue) to find significantly enriched terms among the cellular processes. Only terms enriched with a Bonferroni p-value <0.05 were retained.

Gene Set Name	Genes in Overlap/ Genes in Gene Set	Adjusted p-value
Protein digestion and absorption	18/90	1,26E-04
Aldosterone-regulated sodium reabsorption	8/38	9,89E-03
ABC transporters	8/48	3,50E-02
Transmembrane transport of small molecules	54/594	1,32E-02
ECM-receptor interaction	17/83	9,19E-05
Extracellular matrix organization	30/283	2,77E-02
ECM proteoglycans	10/55	4,91E-02
PI3K-Akt signaling pathway	39/357	2,11E-04
Constitutive Signaling by Aberrant PI3K in Cancer	12/61	2,12E-02
PI5P, PP2A and IER3 Regulate PI3K/AKT Signaling	14/83	2,26E-02
Negative regulation of the PI3K/AKT network	14/90	3,19E-02
PI3K/AKT activation	17/125	3,16E-02
PI3K/AKT Signaling in Cancer Homo sapiens	13/86	5,67E-02
FoxO signaling pathway	16/132	1,56E-02
Rap1 signaling pathway	26/209	7,69E-04
Ras signaling pathway	24/233	1,19E-02
cAMP signaling pathway	26/211	7,97E-04
MAPK signaling pathway	27/294	2,74E-02
TNF signaling pathway	15/110	8,25E-03
Focal adhesion	25/199	7,29E-04
Integrin cell surface interactions	11/67	3,68E-02
Regulation of actin cytoskeleton	23/217	1,09E-02
Axon guidance	23/180	1,05E-03
Axon guidance Homo sapiens R-HSA-422475	50/515	9,22E-03

others: general processes, processes made of multitasking factors,...etc.

Pathways in cancer	48/535	1,91E-03
Melanoma	10/72	4,15E-02
Small cell lung cancer	14/92	4,69E-03
Transcriptional misregulation in cancer	21/183	7,98E-03
Signaling by Interleukins	36/392	5,32E-02
Regulation of lipolysis in adipocytes	9/56	2,75E-02
O-linked glycosylation	16/110	2,92E-02
O-glycosylation of TSR domain-containing proteins	8/38	3,57E-02
Defective B3GALTL causes Peters-plus syndrome (PpS)	8/37	3,43E-02
Semaphorin interactions	11/67	3,50E-02
GAB1 signalosome	16/125	3,54E-02

An analysis centered on genes down-regulated by FOXL2 (i.e., overexpressed when *Foxl2* is depleted), pointed to several dysregulated pathways described in the (Supp. Table 4) and notably some are related to focal adhesion ($p_{adj.} = 0.035$) and ECM-receptor interaction ($p_{adj.} = 0.046$). Genes up-regulated by FOXL2 showed a similar enrichment pattern (Supplementary Table 1), also including a pathway related to ovarian steroidogenesis ($p_{adj.} = 0.046$).

We then looked at genes specifically dysregulated at 54 hours KD (741 up-regulated and 1042 down-regulated by FOXL2), which are expected to be enriched in indirect targets of FOXL2. KEGG pathways analysis shows that there are several enriched pathways detailed in Table 2 and notably related to ovarian function, steroidogenesis and cell migration (Supp. Table 5). Among the DE genes identified we found an over-representation of different genes families such as 12 collagen genes, 5 integrins, 5 Bmp (Bone morphogenetic proteins), 2 Bmpr (Bone morphogenetic proteins receptors), related to cell adhesion and migration (Supp. Table 2).

AKT1 modulates FOXL2 action

As multiple genes related to PI3K-Akt pathways are dysregulated in FOXL2 KD, we decided to study the impact of the serine/threonine protein kinase AKT on the transcriptional activity of FOXL2. In order to demonstrate a possible direct or indirect link between FOXL2 and AKT, we compared our RNA-seq data with those obtained upon *Akt1* KD in similar conditions (18). The overlap contained 67 common DE genes, corresponding to 6% of FOXL2 targets and 15% of AKT targets ($p < 3.703e-23$, hypergeometric distribution) (Figure 2A and Supp. Table 6). This list contained genes involved in cell migration (10% of genes) and cell motility according to the Gene Ontology Biological Process classification (GO BP).

To further test the existence of a functional interaction between AKT and the transcriptional activity of FOXL2, we selected two artificial promoters containing high affinity FOXL2 binding sites (19) and tested their activity in the presence of FOXL2 with or without AKT in the human ovarian granulosa cell tumor-derived KGN line (20). We found that on these two promoters the activity of FOXL2 was reduced in the presence of AKT (Figure 2B) revealing an inhibitory effect of AKT on FOXL2 activity. This effect may be indirect as FOXL2 is not predicted to be a direct target of AKT according NetPhos predictions. However, we cannot exclude an indirect action *via* GSK3 (21), a downstream effector of AKT (NetPhos score: 0.529 for S33, 0.515 for S207 and 0.519 for S234 when using the human FOXL2 sequence).

To confirm the potential inhibitor effect of AKT on FOXL2 activity, the log₂FC for genes DE in the two KD conditions were compared (Figure 2C). This analysis shows that there are four pools of genes

regulated in the same or different directions by AKT and FOXL2. On the upper graph quadrants, genes are down-regulated in *Akt* KD in line with an inhibition of FOXL2 effect. Interestingly, we find among these 22 genes, 9 described to play a role in cell adhesion and migration (such as *Lmo7*, *Cd6and* *Cdhr1*, involved in cell-adhesion; *Arap3*, a GTPase-activating protein that modulates actin cytoskeleton remodeling; *Impg*, a key ECM components and *Adam2*, implicated in cell-cell and cell-matrix interactions). On the lower part, AKT seems to have an activator effect on FOXL2 activity. This is not unexpected given the multiplicity of AKT1 targets (Figure 2C).

Genome-wide identification of potential regulatory elements recognized by FOXL2

To explore what FOXL2-dependent changes of gene expression observed in our RNA-seq data were directly related to FOXL2 DNA/chromatin binding, we performed a ChIP-seq analysis in pGCs (two data points). We identified 1475 FOXL2 ChIPs-seq peaks (Supp. Table 7). The annotation of FOXL2 ChIP-seq peaks revealed that 80% of the binding sites mapped to intergenic regions, whereas only 20% mapped to gene bodies (i.e., promoters, introns and exons) (Figure 3A). Next, we assessed to what extent FOXL2 binding was associated with differential target expression. To address this question, we used previously published data on topologically associating domains (TADs) (22) that are known to be fairly conserved across different cell types (23, 24). A TAD is a genomic region where DNA sequences physically interact with each other more frequently than with sequences outside that region (25). Thus, we focused on DE genes associated to one/or more FOXL2 binding site(s) within the same TAD (Figure 3B). We found 452 ChIP-seq peaks associated with 402 dysregulated genes in 296 TADs. Further, we assessed whether peaks and DE genes mapping to the same TADs were closer in statistical terms than when they were in adjacent TADs (Figure 3C). This analysis showed that ‘events’ (i.e.; peaks and DE genes) within same TAD were closer on average than events in adjacent TADs. To go further on the characterization of these peaks, we split peaks and genes into two categories, peaks associated exclusively with genes either i) down- or ii) up-regulated by FOXL2. Interestingly, we observed a majority of TAD in which genes were regulated by FOXL2 in the same direction (all down-regulated or up-regulated). As our peaks are over-represented in intergenic regions, we hypothesized that they could be localized in enhancer regions. H3K27ac being a marker of active enhancers and promoters (26), we looked for a potential enrichment of H3K27ac marks according to recently published data (27) (Figure 3D). In agreement with our hypothesis, we found that peaks associated with FOXL2 up-regulated genes displayed a correlative enrichment of the H3K27ac marker centered on their summits according to the dataset explored, whereas peaks associated with down-regulated genes belonged to regions with a more even distribution of this epigenetic mark.

Depletion of *Esr2* in mouse primary granulosa cells affects the expression of genes involved in cell migration and extracellular matrix organization

As mentioned in the introduction, FOXL2 is known to modulate the expression of ESR2 with which it co-represses Sox9. Furthermore, FOXL2 interacts directly with several nuclear receptors important for ovarian development and function, including the two estrogen receptors ESR1 and ESR2 (28). These lines of evidence suggest that regulation of gene expression *via* or along with ESR2 may represent an important part of the transcriptional effects of FOXL2(1). Indeed, in addition to controlling the expression of genes involved in estrogen synthesis, FOXL2 directly activates *Esr2* expression and shares common targets with this estrogen receptor thus making a coherent feed-forward loop (1).

In order to further explore the potential co-regulation between FOXL2 and ESR2 of several targets, we knocked-down *Esr2* in pGC under the same conditions as those previously described for FOXL2. RT-qPCR analyses (Figure 4A) confirmed that *Esr2* depletion was greater than 90% at the transcript level. To ensure a good reliability of the potential targets obtained, we focused on DE genes whose expression displayed a 1.5-fold change or more. We identified 352 down- and 131 up-regulated genes upon *Esr2* KD for 30 hours (Fig. 4B) (Supp. Table 8). This represents 40 times as many direct and indirect ESR2 targets compared to the output of our previous previous studie (1). However, both analyses clearly show that ESR2 mostly acts as transcription activator (1). The identified genes underwent an enrichment analysis, either altogether (Figure 4C, dark line of the table) or separately depending on the direction of the regulation by ESR2 (Figure 4C, red and blue lines of the table). Interestingly, GO BP classification showed an enrichment in genes involved in ECM organization and in the regulation of cell migration.

A substantial part of the similarities of the *Esr2* and *Foxl2* KDs, identified in the RNA-seq analysis, can be explained by the existence of common targets. Indeed, the comparison of the DE genes obtained in the relevant KD experiments showed an overlap of 153 DE genes (Supp. Table 9). This corresponds to 15% of FOXL2 targets and around 32% of ESR2 targets ($p < e-106$, hypergeometric test)(Figure 5A). A plot of the Log₂FC values for each gene under the two KD conditions (Figure 5B) shows that a large part of the target sis up-regulated by both FOXL2 and ESR2 (i.e., down-regulated in both siRNA assays). These results are consistent with the fact that FOXL2 acts up-stream ESR2.

To identify joint FOXL2/ESR2 direct targets, we performed a FOXL2 ChIP-seq experiment using pCGs where *Esr2* was knocked-down. This allowed us to identify genomic sites for which the presence of ESR2 was required for FOXL2 binding. Indeed, under the *Esr2* KD condition, we identified only 217 FOXL2 peaks (compared 1475 peaks observed in normal conditions). Out these 217 peaks, 99 peaks

were conserved between the FOXL2 ChIP-seq data in the presence or absence of ESR2, meaning that those peaks are not impacted by the loss of ESR2. Such results show that the presence of ESR2 is important for FOXL2 binding to the chromatin locations found in this study.

We followed the strategy outlined above and further studied the potential 1376 ESR2-dependent FOXL2-binding regions by analyzing the co-occurrence of peaks and DE genes (by both *Foxl2* and *Esr2* KDs) within the same TADs. This analysis involved 90 peaks localized in the vicinity of 59 genes (Supp. Table 10). Of those 59 genes, a large majority (45) displayed a similar deregulation in the KD conditions for both FOXL2 and ESR2, showing cooperation between these two TFs in transcription regulation (Supp. Table 10). Among them, we found genes involved in reproduction, such as *Cyp19a1*, and *Dmrta1* and, not surprisingly, genes involved in cell migration and/or adhesion such as *Phactr1*, *Has2*, *Neb*, *Col10a1* and *Col10a5*. To test whether the associated ChIP-seq peaks contained regulatory elements, we cloned four of them upstream a minimal SV40 promoter driving the expression of the firefly luciferase gene. We chose peaks in the vicinity of coding sequences of *Phactr1*, *Col10a1*, *Neb* et *Col10a5* (Supp Table 10). Next, we co-transfected the relevant constructs along with plasmids driving the expression of FOXL2 and/or ESR2 in KGN cells (human granulosa-derived cells) (Figure 5D). We found that FOXL2 and ESR2 could activate, only together, the expression of luciferase through peaks sequence close to *Phactr1* and *Col10a2*, suggesting a synergistic interaction. We failed to detect any activation through the *Neb* and *Col10a5* peaks sequences. An in-depth analysis of the *Phactr1* peak showed that it contained three forkhead motifs and one motif recognized by ESR2 (Figure 5E). As FOXL2 activates the expression of ESR2 we have here a typical example of a feed forward loop regulating the expression of *Phactr1* (Figure 5F).

FOXL2 and ESR2 are required for efficient granulosa migration and invasion (and adhesion)

As several genes regulated by both FOXL2 and ESR2 are related to cell migration, adhesion, cytoskeleton dynamics regulation and ECM organization, including *Phactr1* (Supp. Table 10), which are also cancer-related processes, we studied the migration potential of two known granulosa cell models in various conditions. For this, we used the AT29C mouse granulosa cell line (29) and KGN cells, a human ovarian cell line derived from an AGCT. As KGN cells harbor the *FOXL2* c.402C>G (i.e., p.C134W) variant, we edited their genome using CRISPR/Cas9 technology to obtain *FOXL2* WT/WT KGN cells (referred to as KGNWT/WT clones 1 and 2). Modified KGN cell lines were able to express WT *FOXL2* as assessed by RT-qPCR and by sequencing the cDNA. To ensure that AT29C and KGN WT/WT cells were suitable granulosa cell models, we tested by RT-qPCR upon *FOXL2* KD the FC of >40 FOXL2 targets identified in RNA-seq experiments. We found significant correlations between our

RNA-seq data in primary cells and the RT-qPCR data in AT29C and KGN over 43 and 46 genes, respectively (Fig. 6A-B). Given these transcriptomic similarities, we studied the migration potential of AT29C cells and KGN cells depleted (or not) for either *Foxl2/FOXL2*, *Esr2/ESR2* or *Phactr1/PHACTR1*. The velocity of migration was assessed using a scratch-wound assay (Figure 6C-E). The speed of wound healing was followed by measuring the slope of the line (μm migrated versus time) in both conditions. Interestingly, for both cell lines the slope was significantly higher in the control compared to the KD condition, meaning that *Foxl2*, *Esr2* and *Phactr1* depletion decreased migration velocity in this experimental setting. Interestingly, the effect of the *Esr2* KD was not totally similar to those *Foxl2* or *Phactr1* KD. This is consistent with the feed-forward regulation of *Phactr1* expression by FOXL2 via the activation of *Esr2* and then a co-regulation by FOXL2 and ESR2 of *Phactr1* (Figure 6E).

The involvement of DE genes in focal adhesion and ECM (Supp. Table 10), mostly down-regulated in both *Foxl2* and *Esr2* KD conditions, prompted us to test the hypothesis that FOXL2, ESR2, and potentially PHACTR1, could be involved in cell invasion. Thus, we performed 3D Matrigel matrix invasion assays when *Foxl2/FOXL2*, *Esr2/ESR2* or *Phactr1/PHACTR1* were knocked-down or not in AT29C and KGN WT/WT cells. These experiments showed that FOXL2, ESR2 (and PHACTR1 ?) do modulate cell invasion in both cell lines (Figure 6F).

Because the transcriptional target of both FOXL2 and ESR2 are enriched in genes involved focal adhesion and cell- ECM contact we tested the hypothesis that they and PHACTR1 could modulate granulosa cell adhesion by assaying the ability of the two different KGN WT/WT clones to adhere. Consistently with our hypothesis, KGN control cell lines adhered faster than KGN depleted for *FOXL2*, (*ESR2* or *PHACTR1*?) (Figure 6G-H) with a maximum difference in adhesion observed after 3 hours of seeding.

Discussion

FOXL2 is known to activate or repress, directly or indirectly, many genes through its interactions with other TFs and co-factors (8). Although this transcriptional role has already been studied, our results highlight many new FOXL2 targets, alone or in interaction with its partner ESR2. To better understand its transcriptional role, alone or in interaction with ESR2, in pGCs, we characterized the FOXL2-dependent alterations in gene expression and chromatin binding. We carried similar transcriptomic experiments for ESR2. The analysis of our RNA-seq data pointed to many DE genes involved notably in important ovarian processes, consistent with our previous observations (1). Interestingly, we also noted a very strong signal concerning genes encoding ECM components or involved in cell migration and decided to get further insights on these processes in connection with FOXL2 and ESR2. We also show that FOXL2 KD deregulates a significant number of genes involved in the PI3K/AKT signaling pathway. This key pathway promotes metabolism, proliferation, cell survival, growth and angiogenesis in response to extracellular signals (reviewed in (30)). This is mediated through serine and/or threonine phosphorylation of a range of downstream substrates. The key protein players of this pathway, namely PI3K and AKT, are known to be implicated in several cancers. As noted in the introduction, we have described in-frame insertions in the open reading frame of *Akt1* in J-GCTs (11). A large number of AKT downstream target substrates have been described (30, 31) and it exerts genomic effects by modulating the activity of various TFs. For instance, by inhibiting the phosphorylation of Forkhead Box O (FOXO) factors, AKT leads to their export from the nucleus (32, 33). FOXL2 is a highly post-translationally modified protein and the modulation of its action by kinases has already been described (21). For instance, GSK3 β (a target of AKT) phosphorylates FOXL2 in Ser33 which paves the way for its subsequent PTM modification, namely by ubiquitination or SUMOylation. Furthermore, J-GCTs are characterized by a decreased *Foxl2* expression (34) and AGCTs bear potentially duplicated copies of candidate co-driver genes such as AKT1 (35). Here, we show that the presence of AKT1 affects the transcriptional activity of FOXL2 on two known target promoters. These results therefore could provide an interesting link between AKT-FOXL2 in to be explored in granulosa cell tumors.

In parallel, we characterized the impact of FOXL2 DNA binding, followed by chromatin immunoprecipitation, the regulation of its transcriptional targets. ChIP-seq experiments revealed that FOXL2 binds to thousands of genomic locations, which is consistent with previous results (1). Recently, it has been shown that disruption of TAD structures, by altering their boundaries, lead to gene misexpression due to the appearance of ectopic contacts between cis-regulating elements (36–41). Thus, we set up to match FOXL2 binding sites and DE genes mapping to the same TAD (i.e.,

potential direct targets of FOXL2). This approach allowed us to identify a set of DE genes associated with potentially functional binding of FOXL2 (i.e., suggestive of the existence of regulatory elements recognized by FOXL2). Consistent with the TAD model, where chromatin is segregated into either active and repressed compartments (42), we observed a majority of TAD in which genes were all down-regulated or up-regulated by FOXL2. It is worth noting that FOXL2-activated genes were enriched in FOXL2 peaks associated to H3K27ac mark while FOXL2-repressed genes were not, suggesting that FOXL2 activates transcription through binding enhancers sites. This is also consistent with the CHIP peaks being also enriched in intergenic regions.

The comparison between RNA-seq data obtained after the KD of both *Foxl2* and *Esr2* showed an overlap of 153 DE genes, corresponding to a large part of ESR2 targets. This result is consistent with i) previous evidence suggesting that FOXL2 has a major impact on estradiol signaling through its direct regulation of *Esr2* (1) and ii) with the similar trans-differentiation of granulosa cells in mice depleted for *Foxl2* or *Esr1/Esr2* (3). Among the main DE genes responding to *Foxl2* or *Esr2* depletion, we found significant a enrichment in those involved in ECM organization and cell migration. To better dissect the FOXL2-ESR2 interplay, we also characterized the impact of ESR2 on FOXL2 DNA-binding. The absence on the market of CHIP-grade antibodies against ESR2, prevented us from studying ESR2-binding sites. We used RNAi to deplete *Esr2* in mouse pGC and performed CHIP of FOXL2. We show that FOXL2 fixation at specific locations in genome required the presence of ESR2. Indeed, the depletion of *Esr2* drastically affected FOXL2 fixation dividing by ten the number of identified sites. The joint FOXL2-ESR2 binding sites can potentially co-regulate the expression of genes involved in ovarian steroidogenesis such as *Cyp19a1* and cell migration. Our results shows that FOXL2 controls ESR expression but the latter is important for FOXL2 binding to a significant number of chromatin/DNA sites. However, this is not representative of what was observed in RNA-seq data, where only 15% of FOXL2 targets were affected by the depletion of *Esr2*. One potential explanation is that our CHIP analysis focused on 2 475 FOXL2 binding sites (common between 2 FOXL2 CHIP conditions) to prevent false positive peaks. However, this may have also removed true positive peaks. Another possibility is that a fraction of FOXL2 peaks requiring the presence of FOXL2 are not involved in the control of gene expression (reviewed in (43)). More exhaustive studies with CHIP-grade anti-ESR2 antibodies involving sequential CHIP are required to shed more light on this standing issue. We were also able to show that both FOXL2 and ESR2 can act on a regulatory sequence in the vicinity of *Phactr1*. Their synergistic interaction leads to the up-regulation of *Phactr1* in granulosa cells. This is a typical example of a feed-forward loop (i.e., FOXL2 activates *Esr2* expression and both TFs co-activate *Phactr1*). The implication of *Phactr1* in cell migration has been shown in a mouse brain capillary endothelial cell line (44). *Phactr1* is also known to be expressed in the oocyte (45) but

nothing is known about its function in the ovary. As several genes regulated by FOXL2 and ESR2 were related to cell migration, we investigated if this effect could be related to *Phactr1* down-regulation. Cell migration assays using KGN WT/WT and AT29C granulosa cell models depleted or not for *Foxl2*, *Esr2* or *Phactr1* independently showed a strong slow-down of cell migration. Granulosa cells have already been reported to migrate in response to human chorionic gonadotropin (an LH analog) (46). Our results on the role of FOXL2 and ESR2 in granulosa cell migration, very likely through the regulation of *Phactr1* expression, show a process largely overlooked thus far. Interestingly, a previous study from our group highlighted a potential effect of AKT1 in slowing down granulosa cell migration (18) whereas according to our present results FOXL2 promotes this process. To reconcile both findings, we propose that AKT1 inhibits FOXL2 activities on a subset of genes promoting cell migration. Such regulation is expected to be independent of GSK3, because the latter has been described as inhibiting the activity of FOXL2 by phosphorylation of serine 33 (18).

Among the FOXL2 and ESR2 common target genes, we also noticed an enrichment in genes involved in ECM organization. Consistently, we were able to show that depletion of either *Foxl2* or *Esr2* are associated with a loss of the invasive proprieties in both mouse and human granulosa cells, similar to the one observed in *Phactr1* depletion.

Our results taken altogether confirm and extend the role of this FOXL2 in critical cellular granulosa processes. Our data provide a series of new candidates that deserve further investigation. This study also reveals that, in granulosa cells, AKT may inhibit FOXL2 on a specific set of genes. Taking into account that *AKT1* duplications we found J-GCTs lead to kinase hyperactivity, our data lay the bases for a better understanding of the mechanisms underlying the occurrence of this pathology and a potential link with the adult form of GCTs.

All in all, we propose a model based on the existence of a coherent feed-forward loop in which FOXL2 stimulates both E2 production and its receptivity *via* ESR2 and lead to the co-activation of a large gene subset critical for ovarian function.

Materials and methods

Cells culture

Murine primary granulosa cells were collected from ovaries of 8-week-old female Swiss mice (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, France) and cultured as described in ref. (1). The cell line AT29C derived from a mouse ovarian tumor was kindly provided by Dr. N. Di Clemente and cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% Penicillin-Streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) (29). KGN cells(20) were grown in DMEM-F12 medium supplemented with 10% FBS and 1% Penicillin-Streptomycin (Invitrogen-Gibco).

Cells Genome editing

KGN cells were genome-edited using CRISPR-Cas9. Briefly, sgRNAs were designed using a web-based CRISPR design tool (<http://crispor.tefor.net/>) and cloned into GeneArt CRISPR Nuclease Vector with GFP reporter (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instruction. 2.10^5 cells KGN cells were seeded in 6 wells plate and were transfected when 70% of confluence was reached with CRISPR plasmid using Lipofectamine 2000 (Life technologies) according to manufacturer protocol, overnight. The next day, attached cells were cultured in DMEM-F12 supplemented by 10% FBS for an additional 24h before fluorescence activated cell sorting (FACS) to select only cells expressing GFP. Monoclonal cell lines were obtained by limiting dilution. Clones were screened by allele-specific PCR, with primers designed to amplify WT allele or p.C134W allele. Positive clones (amplification of WT allele or mutated allele) only were sequenced by Sanger sequencing technology.

Transfection and reagents

Cells were transiently transfected in 6-well plates (same conditions as above) with 30 pmoles of a pool of 3 different siRNAs against *Foxl2* (Dharmacon, ON-TARGETplus siRNAs, pool KD1: J-040709-06-0005, J-040709-07-0005, J-040709-08-0005, KD2: J-040709-06-0005, J-040709-08-0005, J-040709-09-0005, KD3: J-040709-06-0005, J-040709-07-0005, J-040709-09-0005 and KD4: J-040709-07-0005, J-040709-08-0005, J-040709-09-0005) or 30 pmoles of a pool of 3 different siRNAs against *Esr2* (Dharmacon, ON-TARGETplus siRNAs, pool KD1: J-040709-06-0005, J-040709-07-0005, J-040709-08-0005, KD2: J-040709-06-0005, J-040709-08-0005, J-040709-09-0005, KD3: J-040709-06-0005, J-040709-07-0005, J-040709-09-0005 and KD4: J-040709-07-0005, J-040709-08-0005, J-040709-09-

0005) or 30 pmoles of 2 different siRNAs against *Phactr1*(SASI_Mm01_00094617 and SASI_Mm01_00094618) or an equal amount of the control/scrambled siRNA (Dharmacon, D-001810-10-05) using Lipofectamine RNAiMax (Thermo Fisher Scientific).

For human cell lines, we used a pool of 3 different siRNAs against *FOXL2* (Dharmacon, ON-TARGETplus siRNAs, pool KD1: J-009075-06-005, J-009075-07-005, J-009075-08-005, KD2: J-009075-06-005, J-009075-07-005, J-009075-09-005 , KD3: J-009075-06-005, J-009075-08-005, J-009075-09-005 and KD4: J-009075-07-005, J-009075-08-005, J-009075-09-005) or 30 pmoles of a 2 different siRNAs against *ESR2* (SIGMA Aldrich, SASI_Hs01_00014343 and SASI_Hs01_00014345) or 30 pmoles of 2 different siRNAs against *PHACTR1* (SIGMA Aldrich, SASI_Hs01_00154421 and SASI_Hs01_00308926).

Six hours after transfection, the mix was replaced by culture medium and cells were allowed to grow for 24h before performing subsequent experiments or 48h.

RNA extraction and sequencing

RNA extraction was performed 30h after transfection, following the TRI-reagent supplier's instructions (MRC). 1.3 µg of total RNAs underwent high throughput sequencing at the IMAGIF platform (<https://www.i2bc.paris-saclay.fr/>, Gif-sur-Yvette, France). Specifically, total RNA quality was assessed on an Agilent Bioanalyzer 2100, using RNA 6000 pico kit (Agilent Technologies). Directional RNA-Seq Libraries were constructed using the TruSeq mRNA Stranded library prep kit (Illumina), following the manufacturer's instructions. Final library quality was assessed on an Agilent Bioanalyzer 2100, using an Agilent High Sensitivity DNA Kit. Libraries were pooled in equimolar proportions and sequenced on Single Read 75pb runs, on an Illumina NextSeq500 instrument, using NextSeq 500 High Output 75 cycles kits. Demultiplexing was performed using bcl2fastq2 V2.15.0 and adapters were removed with Cutadapt1.9.1. Only reads longer than 10pb were kept for analysis (about 10,000,000 reads per sample). Reads were mapped on the mouse genome (mm10) with TopHat2. Mapped reads were assigned to features with features count (1.5.0-p2) and differential analysis was performed with DESeq2 (47). Thus, the p values were adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method, and those with an adjusted p value < 0.05 were considered to be significant. Data were deposited in Gene Expression Omnibus (Series GSEXXXXX).

Chromatin immunoprecipitation

ChIP-IT High Sensitivity kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA) was used to determine the association of TF FOXL2 with its specific genomic region. After 9 days of culture, cells grown to confluence in three 150-mm plates were subjected to fixation, chromatin sonication, immunoprecipitation and DNA purification. The immunoprecipitated fraction was analysed by RT-qPCR to determine the abundance of the target DNA sequences relative to the input chromatin. The library was prepared with the DNA SMART ChIPseq Kit (Takara Bio, USA) according to manufacturer's recommendations with 18 PCR cycles amplification. ChIP-Seq was performed by the Platform IMAGIF from the French Centre National de la Recherche Scientifique (<https://www.i2bc.paris-saclay.fr/>, Gif-sur-Yvette, France) on an Illumina HiSeq1000 instrument using standard protocols (single reads). The reads in fastq files were imported on the Galaxy server (<https://usegalaxy.org/>). Reads were mapped on mm10 Canonical Female genome using Map Bowtie for Illumina tool with standard settings. Unmapped reads were then removed using the Filter SAM tool. Peak calling was performed using MACS2 tool. Peaks with an FDR <0.05 were kept for further analysis.

Luciferase assays

KGN cells were seeded 16h prior to transfection at a density of 4.10_4 cells/cm² and transfected using the calcium-phosphate method as previously described(6). The activity of luciferase reporter constructs was assessed by the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Relative luciferase units represent the ratio of firefly luciferase activity over renilla luciferase activity in the samples. Each value represents the mean of six independent experiments, and standard error bar represent the standard deviation (SD).

Cell migration assay

Cell velocity was assessed by a scratch-wound assay. AT29C or KGN cells, either the control or KD were trypsinized 24h after transfection. 3.5×10^5 cells per well were plated in 24-well plates. When cells reached confluence, a thin wound was produced by scratching the cell layer with a pipette tip. Image acquisition of wound closure was performed using the IncuCyte ZOOM live-cell analysis system (Essen BioScience). Images of three fields along the diameter of the well were taken at 4X magnification with the Basler scout scA1400-30gm monochrome camera every 2h during 12h. Wound closure was measured by calculating the decrease of the wound area over time (t) with

respect to the initial area (t_0) ($areat/areat_0$) using Fiji software (48). The slope of the line generated in the different conditions was estimated using a curve fitter online tool (<http://statpages.info/nonlin.html>), then the significance of the difference between the slopes of the KD and control conditions were estimated using an online statistic calculator (<https://www.danielsoper.com/statcalc/calculator>)(49). Three independent experiments were performed, with minimum 2 wells per condition.

Cell adhesion assay

KGN and AT29C cells transfected with *siSCR*, *siFOXL2* or *siESR2* were mechanically dissociated with Trypsin 0.05% and $3 \cdot 10^5$ cells suspended in 200 μ L of DMEM-F12 (or DMEM) with 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycine were plated in 48-well tissue culture plates. Cells were allowed to adhere to the plates at 37°C for the times indicated in Figure 6, and then the culture medium was entirely removed and the cells werewashed three time with 1mL of PBS and dissociated with 100 μ L of trypsin for direct counting. Three independent experiments (two for the moment) were carried out, with in each case a duplicate for each condition.

Cell invasion assay

To study cell invasion, the QCM™ Endothelial Cell Invasion Assay (24 well, fluorometric) (Sigma-Aldrich) was used according to manufacturer's instructions. Briefly, after transfection cells were starved for 12h before invasion assay in DMEM-F12 (or DMEM) without FBS. Then, cells were trypsinized, resuspended in appropriate medium without FBS, counted and 100 μ L at $1 \cdot 10^6$ cells were added in boyden chambers (in triplicate for each condition) while medium with serum were placed in the well below. Invading cells were left to move through the pores toward the FBS gradient for 20 hours. Invading cells were coloured and absorbance is mesuread at 570 nm.

Figures legends

Figure 1: Exploration of the genomic effects of FOXL2 in primary granulosa cells.

A. Efficiency of *Foxl2* depletion after 30 h and 54 h of culture in the samples sent for RNA-seq normalized by *ActinB* expression. The mean KD efficiency in the RT-qPCR experiments ranged from 83% in 30 hours to 90% in 54 hours KD compared to the control condition. Mouse pGC were transfected with a non-targeting siRNA for Ctrl (3 replicates) or with a combination of 3 siRNA targeting *Foxl2* (p1 refers to a knock-down condition in which cells were treated with the siRNA combination 1, p2 with the combination 2, etc).

B. Anti-FOXL2 Western blot results after 30 hours of siRNA treatment KD (controle/Ctrl) or with 4 different pools of siRNA targeting *Foxl2*. Such samples were sent for RNA-seq.

C. Scatter plot showing the \log_2 gene expression values for *siFoxl2* versus the Ctrl condition. The red and blue dots denote the down- an up-regulated genes between the two conditions, respectively. Light colors show differentially expressed (DE) genes in the 30 h KD and dark colors show genes DE genes in 54 h KD experiment.

D. Venn diagram (left) representing the overlap between the DE genes after *Foxl2* depletion for 30 h or 54 h and Venn diagrams (right) representing the partition of up-regulated (in blue) and down-regulated genes (in red).

E. The $\log_2(\text{FC})$ for *siFoxl2* KD/Ctrl for 30h and *siFoxl2* KD54. Each line represents one gene. Red lines and blue lines show down- and up-regulated genes in the *siFoxl2* conditions (i.e., directly or indirectly activated and repressed by FOXL2, respectively). Yellow lines show the mean dysregulation level.

F. Heatmap representing the relative expression values (TPM normalization) of FOXL2 targets in various conditions (biological triplicates -1, 2 and 3- for Ctrl and KD conditions at 30h and 54h of siRNA treatment). A bootstrapped hierarchical clustering was performed using Euclidian clustering and the dendrogram is represented on the left. Over-expressed genes (repressed by FOXL2) are in blue and under-expressed in red. The lighter the color is, the weaker the deregulation is. Normalized signal intensities were treated using the MultiExperiment Viewer (MeV) software by applying significance analysis for microarrays (SAM) test in unsupervised mode.

Figure 2:

A. Venn diagram representing the intersection of FOXL2 targets from our data and genes whose expression was modified upon Akt KD for 30 h of siRNA treatment (18).

B. Luciferase assay showing the inhibition of FOXL2 by AKT on dAT29Cns and 4xFLRE promoters cloned upstream of a minimal CMV promoter driving the expression of firefly luciferase gene (described in (6)), and a construct for the Renilla luciferase. Experiments were performed in KGN cells in triplicates. p-values were estimated according to a Student's t test between the indicated conditions : **p<0.01, ***p<0.001.

C. Correlation between log₂FC (*siFoxl2/Ctrl*) and log₂FC (*siAkt/Ctrl*) over the 61 common DE genes. We propose several scenarios according to which AKT would regulate, positively or negatively, FOXL2.

Figure 3:

A. Enrichment analysis of FOXL2 peaks at various genome locations showing a strong over-representation in intergenic regions.

B. Schematic representation of a DE gene (blue rectangle) mapping close to a ChIPseq peak (yellow circle) within the same TAD. In our analysis, we hypothesize that in such cases functional interactions are more likely (i.e. FOXL2 binding to chromatin affects transcription of its targets within the TAD). d is the distance between the peak and the DE gene.

C. Boxplot of the distance (in bp) between a peak and a gene located within the same TAD or between a peak and a gene located in the previous or the next TAD (even when there is a gene in the same TAD as a described peak).

D. Distribution of FOXL2 peaks around H3K27ac marks of two distinct datasets (27). The analysis shows, in the top panel, peaks associated with FOXL2 up-regulated genes and, in the bottom panel, peaks associated with FOXL2 down-regulated genes. A stronger enrichment can be observed for FOXL2 peaks in the vicinity of FOXL2-activated targets.

Figure 4:

A. Efficiency of *Esr2* depletion after 30 h of culture in the samples sent for RNA-sequencing. Error bars represents triplicate experiment and are referred for *Esr2* to KD condition in which cells with the combination 1, 2 or 3 (as described in MM). Mouse pGC were transfected with a control siRNA (Ctrl, 3 replicates) or with a combination of 3 siRNA targeting *Esr2* (KD1 refers to a knock-down condition in which cells were treated with the combination 1, KD2 with the combination 2, etc).

B. Diagram representing the number of targets down-regulated by ESR2 in blue (up in *siEsr2* conditions) and up-regulated targets in red (down in *siEsr2* conditions).

C. GO biological process term enrichment among ESR2 targets in pGCs (in dark line), up-regulated targets (in red line) and down-regulated targets (in blue line).

Figure 5:

A. Venn diagram representing the intersection of FOXL2 targets with ESR2 targets in our RNA-seq data.

B. Correlation of the \log_2FC (*siFoxl2/Ctrl*) and \log_2FC (*siEsr2/Ctrl*) effect on the 153 common genes, showing a clear enrichment for targets both up-regulated by FOXL2 and ESR2 (lower left part).

C. Venn diagram showing the overlap between peaks identified in the ChIP-seq of FOXL2 in pGC treated with Ctrl siRNAs (yellow circle) and peaks identified in the ChIP of FOXL2 in pGC treated with *siEsr2* (green circle).

D. Luciferase assay showing the effect of FOXL2 and ESR2 alone or together on peaks identified in our ChIP-seq analysis. Peaks were cloned upstream of a minimal CMV promoter driving the expression of firefly luciferase gene, and a construct for the Renilla luciferase was used as a transfection control. Experiments were performed in KGN cells in triplicates. p-values according to a Student's t test between the indicated conditions : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

E. Motif analysis by AME (MEME suite) of the peak identified at vicinity of *Phactr1*. Forkhead motifs are in blue and an ESR2 motif in green.

G. Feed-forward regulation of *Phactr1* expression. FOXL2 induces *Cyp19* expression which encodes the aromatase that is a key enzyme in estradiol E2 production. FOXL2 also induces *Esr2* expression whose ligand is E2. Then, FOXL2 and ESR2 together co-activate *Phactr1* expression.

Figure 6: FOXL2 and ESR2 impair cell migration through regulation of Phactr1 expression and cell adhesion in culture granulosa cell lines.

A. Correlation of the log₂FC (*siFoxl2/Ctrl*) in RNA-seq data and log₂FC (*siFoxl2/Ctrl*) in mouse immortalized granulosa cells (AT29C) assessed on 43 genes by qPCR and normalized by GAPDH. Pearson correlation coefficient of 0.65 shows a high degree of correlation between the two KDs.

B. Correlation of the log₂FC (*siFoxl2/Ctrl*) in RNA-seq data and log₂FC (*siFoxl2/Ctrl*) in mouse immortalized granulosa cells (KGN WT/WT clone 1) assessed on 43 genes by qPCR and normalized by GAPDH. Pearson correlation coefficient of 0.62 shows a high degree of correlation between the two KDs.

C. Typical examples of scratch wound assays on AT29C treated with a control siRNA (top panel) or *siFoxl2* (lower panel) at 0 h and at 8 h after wounding. Image magnification: 4x.

D. Results of the scratch-wound assay on AT29C cells. We plotted the mean wounded (cell free) area expressed as a fraction of the initial area (i.e., *siSCR/Ctrl*, light yellow line), *siFoxl2* (orange line), *siEsr2* (green line) and *siPhactr1* (purple line) conditions. The slopes of the lines (rate of decrease of the cell free area) were significantly different between *siFoxl2*, *siEsr2* and *siPhactr1* in comparison with the control. *siEsr2* was also significantly different from *siFoxl2* and *siPhactr1*. Experiments were repeated three times. The significance of the difference between slopes was estimated and described in material and methods. **<0.01, ***<0.001.

E. Results of the scratch-wound assay on KGN FOXL2 WT/WT clone 1 in four conditions *siFOXL2/siESR2/siPHACTR1* and Ctrl. The experiment was repeated three times. *<0.05.

F. Results of invasion assay for AT29C and KGN WT/WT clones. Cells treated with *siSCR* (as control), *siFoxl2/siFOXL2*, *siEsr2/siESR2* and *siPhactr1/siPHACTR1* were plated in Boyden chamber in starving medium. Invasion through membrane was driven by a gradient of FBS between the Boyden chamber (without FBS) and the well besides (with 10% FBS).

G. Results of adhesion assay for KGN WT/WT (clone 1 (**left panel**) and 2 (**right panel**)) on wells plates coated by Nucleon®. Cells treated with *siSCR* (grey line) and *siFoxl2* (yellow line) (54 hours KD) were plated 48 wells plates with DMEM-F12, 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin and were allowed to adhere to the plates at 37°C for the times indicated (90, 180, 270 and 360 minutes). Adherent cells were counted in two duplicates for each condition.

References

1. A. Georges, *et al.*, The transcription factor FOXL2 mobilizes estrogen signaling to maintain the identity of ovarian granulosa cells. *Elife* **3** (2014).
2. D. Schmidt, *et al.*, The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* **131**, 933–942 (2004).
3. N. H. Uhlénhaut, *et al.*, Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation. *Cell* **139**, 1130–1142 (2009).
4. L. Crisponi, *et al.*, The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat. Genet.* **27**, 159–166 (2001).
5. A. Dipietromaria, *et al.*, Towards a functional classification of pathogenic FOXL2 mutations using transactivation reporter systems. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 3324–3333 (2009).
6. A.-L. Todeschini, *et al.*, Mutational probing of the forkhead domain of the transcription factor FOXL2 provides insights into the pathogenicity of naturally occurring mutations. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 3376–3385 (2011).
7. S. P. Shah, *et al.*, Mutation of FOXL2 in Granulosa-Cell Tumors of the Ovary. *New England Journal of Medicine* **360**, 2719–2729 (2009).
8. M. D. Pisarska, G. Barlow, F.-T. Kuo, Minireview: Roles of the Forkhead Transcription Factor FOXL2 in Granulosa Cell Biology and Pathology. *Endocrinology* **152**, 1199–1208 (2011).
9. J. F. Couse, *et al.*, Postnatal Sex Reversal of the Ovaries in Mice Lacking Estrogen Receptors α and β . *Science* **286**, 2328–2331 (1999).
10. N. Kalfa, *et al.*, Extinction of FOXL2 expression in aggressive ovarian granulosa cell tumors in children. *Fertil. Steril.* **87**, 896–901 (2007).
11. L. Bessièrre, *et al.*, A Hot-spot of In-frame Duplications Activates the Oncoprotein AKT1 in Juvenile Granulosa Cell Tumors. *EBioMedicine* **2**, 421–431 (2015).
12. S. Mouilleron, M. Wiezlak, N. O'Reilly, R. Treisman, N. Q. McDonald, Structures of the Phactr1 RPEL Domain and RPEL Motif Complexes with G-Actin Reveal the Molecular Basis for Actin Binding Cooperativity. *Structure* **20**, 1960–1970 (2012).
13. M. Wiezlak, *et al.*, G-actin regulates the shuttling and PP1 binding of the RPEL protein Phactr1 to control actomyosin assembly. *Journal of Cell Science* **125**, 5860–5872 (2012).
14. A. Enomoto, *et al.*, Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev. Cell* **9**, 389–402 (2005).
15. G. Xue, B. A. Hemmings, PKB/Akt-dependent regulation of cell motility. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 393–404 (2013).
16. K. Dohoon, *et al.*, Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *The FASEB Journal* **15**, 1953–1962 (2001).

17. M. Kanehisa, S. Goto, KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* **28**, 27–30 (2000).
18. M. Elzaiat, *et al.*, High-throughput Exploration of the Network Dependent on AKT1 in Mouse Ovarian Granulosa Cells. *Molecular & Cellular Proteomics* **18**, 1307–1319 (2019).
19. D. L'Hôte, *et al.*, Discovery of novel protein partners of the transcription factor FOXL2 provides insights into its physiopathological roles. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 3264–3274 (2012).
20. Y. Nishi, *et al.*, Establishment and Characterization of a Steroidogenic Human Granulosa-Like Tumor Cell Line, KGN, That Expresses Functional Follicle-Stimulating Hormone Receptor. *Endocrinology* **142**, 437–445 (2001).
21. J.-H. Kim, *et al.*, FOXL2 posttranslational modifications mediated by GSK3 β determine the growth of granulosa cell tumours. *Nature Communications* **5** (2014).
22. B. Bonev, *et al.*, Multiscale 3D Genome Rewiring during Mouse Neural Development. *Cell* **171**, 557-572.e24 (2017).
23. J. R. Dixon, *et al.*, Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* **485**, 376–380 (2012).
24. S. S. P. Rao, *et al.*, A 3D Map of the Human Genome at Kilobase Resolution Reveals Principles of Chromatin Looping. *Cell* **159**, 1665–1680 (2014).
25. A. Pombo, N. Dillon, Three-dimensional genome architecture: players and mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 245–257 (2015).
26. M. P. Creighton, *et al.*, Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 21931–21936 (2010).
27. S. A. Garcia-Moreno, *et al.*, Gonadal supporting cells acquire sex-specific chromatin landscapes during mammalian sex determination. *Developmental Biology* **446**, 168–179 (2019).
28. V. Khristi, *et al.*, ESR2 regulates granulosa cell genes essential for follicle maturation and ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology* **474**, 214–226 (2018).
29. M. Dutertre, *et al.*, Ovarian granulosa cell tumors express a functional membrane receptor for anti-Müllerian hormone in transgenic mice. *Endocrinology* **142**, 4040–4046 (2001).
30. B. D. Manning, L. C. Cantley, AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261–1274 (2007).
31. T. Ersahin, N. Tuncbag, R. Cetin-Atalay, The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol Biosyst* **11**, 1946–1954 (2015).
32. A. Brunet, *et al.*, Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857–868 (1999).
33. W. H. Biggs, J. Meisenhelder, T. Hunter, W. K. Cavenee, K. C. Arden, Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 7421–7426 (1999).

34. R. Rosario, C. Blenkiron, A. N. Shelling, Comparative study of microRNA regulation on FOXL2 between adult-type and juvenile-type granulosa cell tumours in vitro. *Gynecologic Oncology* **129**, 209–215 (2013).
35. S. Caburet, *et al.*, Combined comparative genomic hybridization and transcriptomic analyses of ovarian granulosa cell tumors point to novel candidate driver genes. *BMC Cancer* **15**, 251 (2015).
36. W. A. Flavahan, *et al.*, Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. *Nature* **529**, 110–114 (2016).
37. M. Franke, *et al.*, Formation of new chromatin domains determines pathogenicity of genomic duplications. *Nature* **538**, 265–269 (2016).
38. D. Hnisz, *et al.*, Activation of proto-oncogenes by disruption of chromosome neighborhoods. *Science* **351**, 1454–1458 (2016).
39. D. G. Lupiáñez, *et al.*, Disruptions of Topological Chromatin Domains Cause Pathogenic Rewiring of Gene-Enhancer Interactions. *Cell* **161**, 1012–1025 (2015).
40. D. G. Lupiáñez, M. Spielmann, S. Mundlos, Breaking TADs: How Alterations of Chromatin Domains Result in Disease. *Trends in Genetics* **32**, 225–237 (2016).
41. J. Weischenfeldt, *et al.*, Pan-cancer analysis of somatic copy-number alterations implicates IRS4 and IGF2 in enhancer hijacking. *Nat Genet* **49**, 65–74 (2017).
42. Q. Szabo, F. Bantignies, G. Cavalli, Principles of genome folding into topologically associating domains. *Science Advances* **5**, eaaw1668 (2019).
43. A.-L. Todeschini, A. Georges, R. A. Veitia, Transcription factors: specific DNA binding and specific gene regulation. *Trends in Genetics* **30**, 211–219 (2014).
44. Y. Jing, *et al.*, Phosphatase Actin Regulator-1 (PHACTR-1) Knockdown Suppresses Cell Proliferation and Migration and Promotes Cell Apoptosis in the bEnd.3 Mouse Brain Capillary Endothelial Cell Line. *Medical Science Monitor* **25**, 1291–1300 (2019).
45. G. Kakourou, *et al.*, Investigation of gene expression profiles before and after embryonic genome activation and assessment of functional pathways at the human metaphase II oocyte and blastocyst stage. *Fertility and Sterility* **99**, 803-814.e23 (2013).
46. A. Rolaki, *et al.*, Luteogenic Hormones Act through a Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Mechanism to Up-Regulate $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ Integrins, Promoting the Migration and Survival of Human Luteinized Granulosa Cells. *The American Journal of Pathology* **170**, 1561–1572 (2007).
47. M. I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* **15**, 550 (2014).
48. J. Schindelin, *et al.*, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
49. , Significance of the Difference between Two Slopes References - Free Statistics Calculators (January 11, 2019).

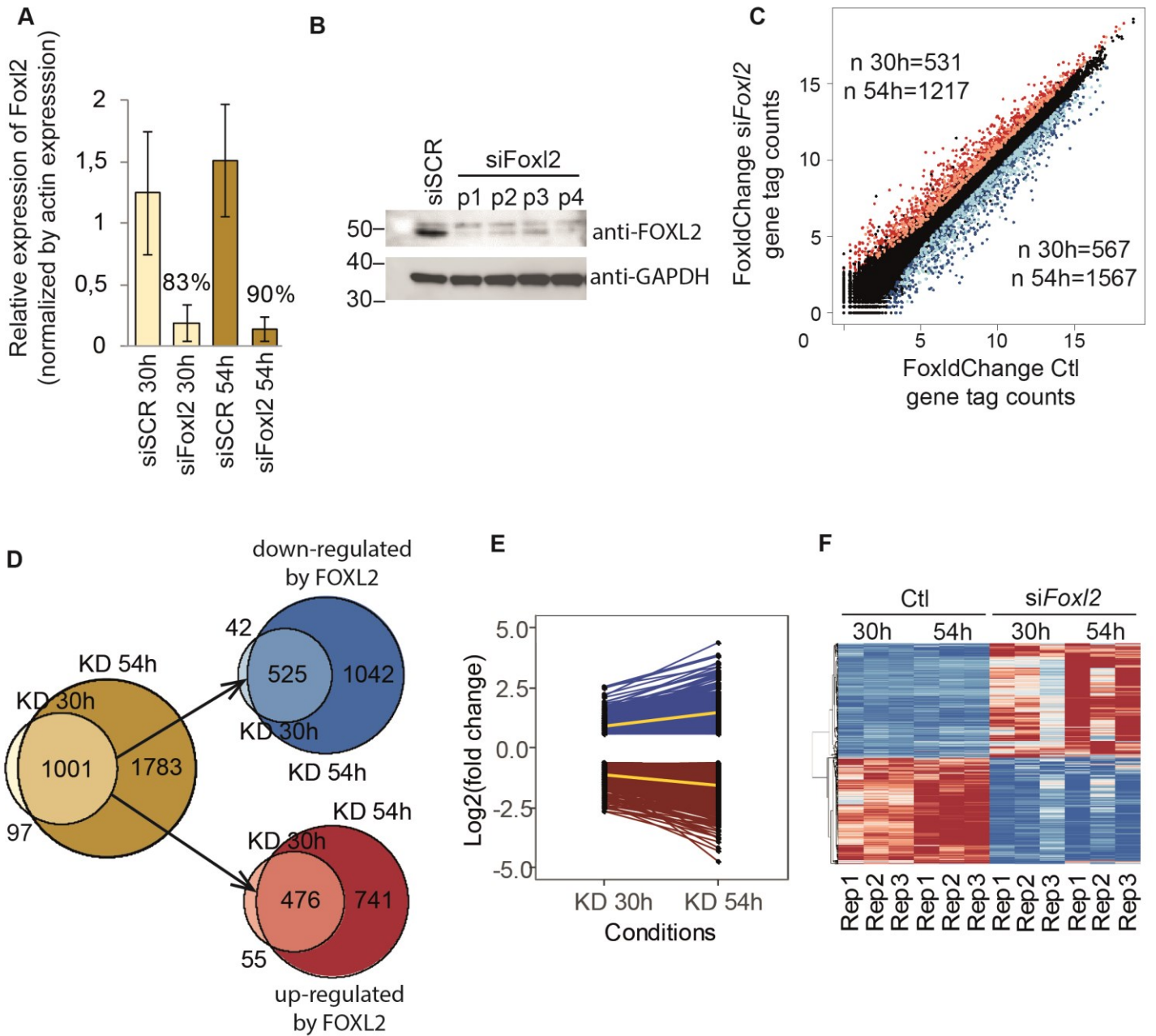


FIGURE 1

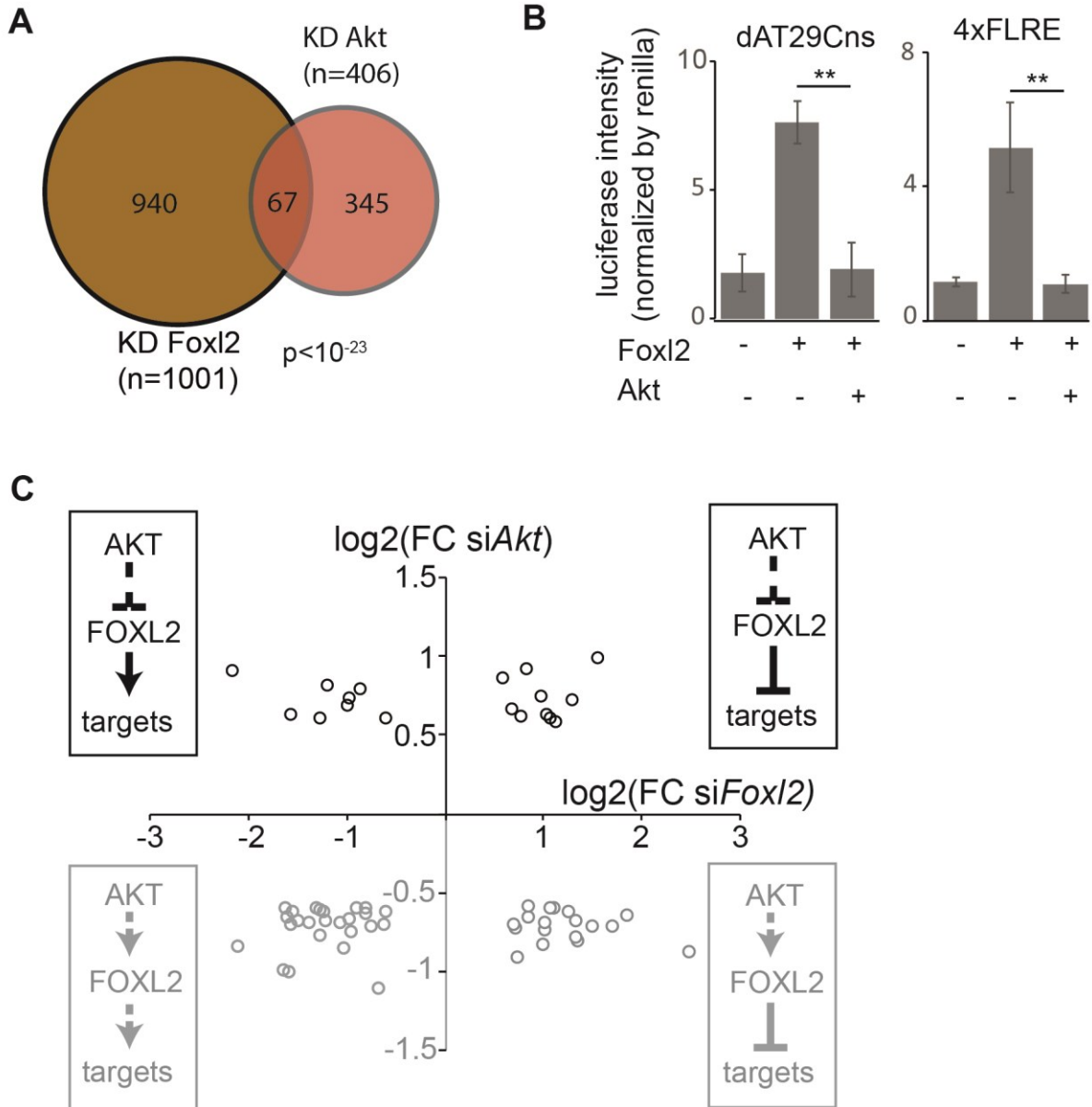


FIGURE 2

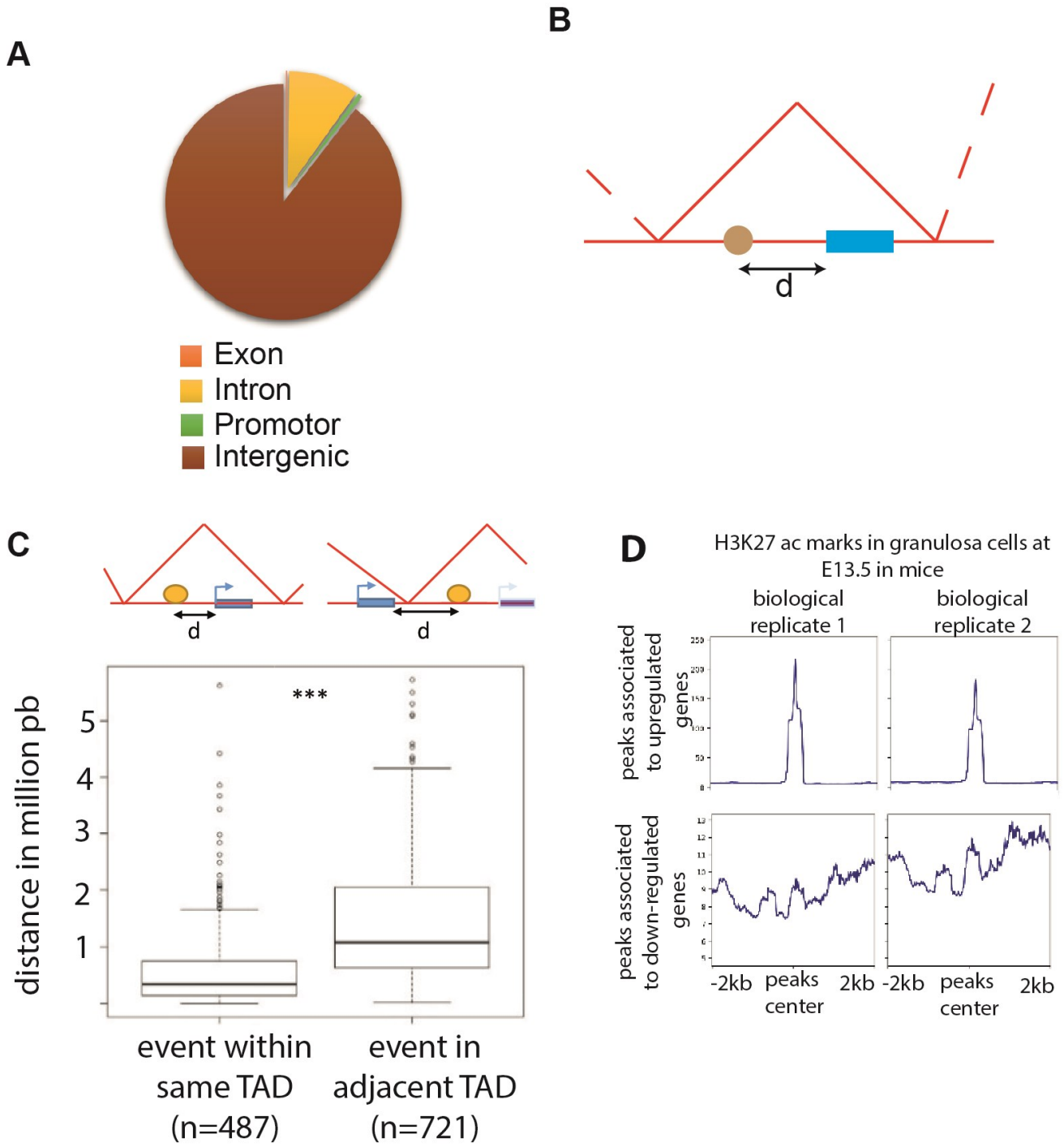
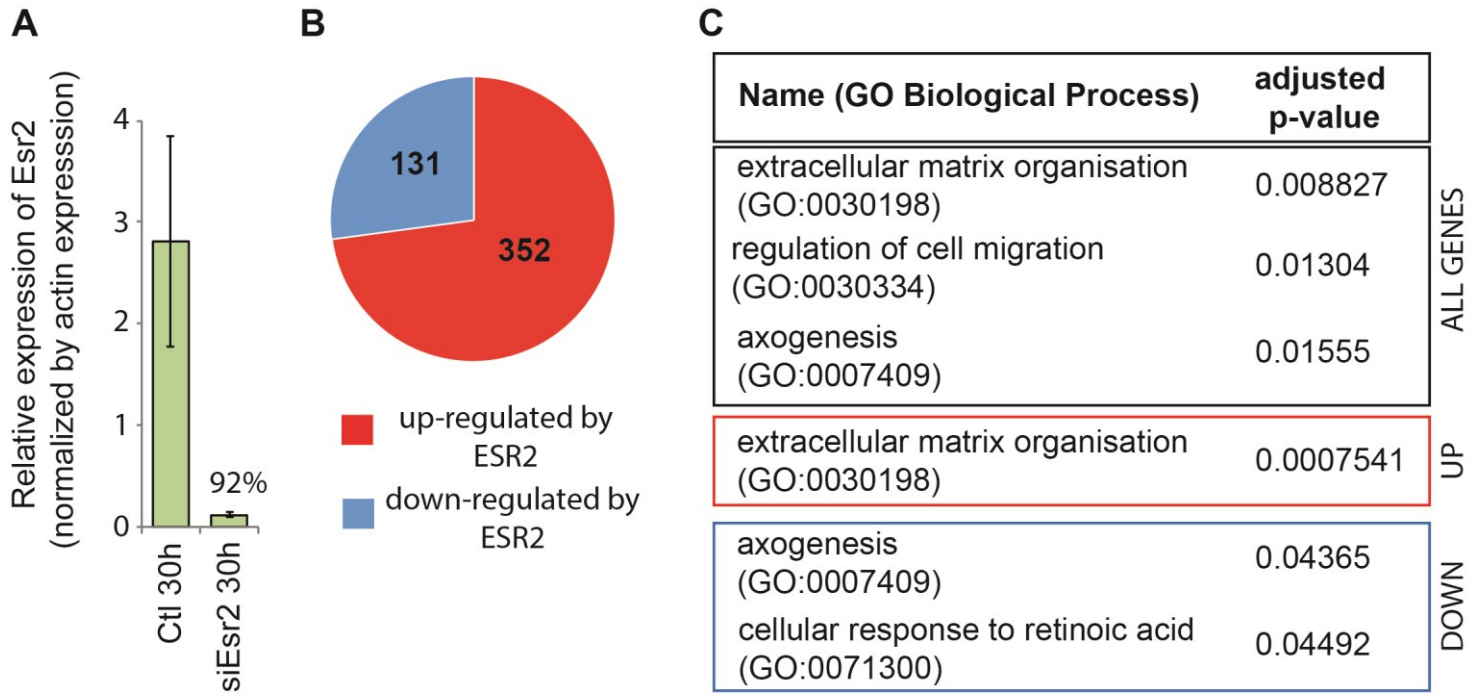


FIGURE 3

**FIGURE 4**

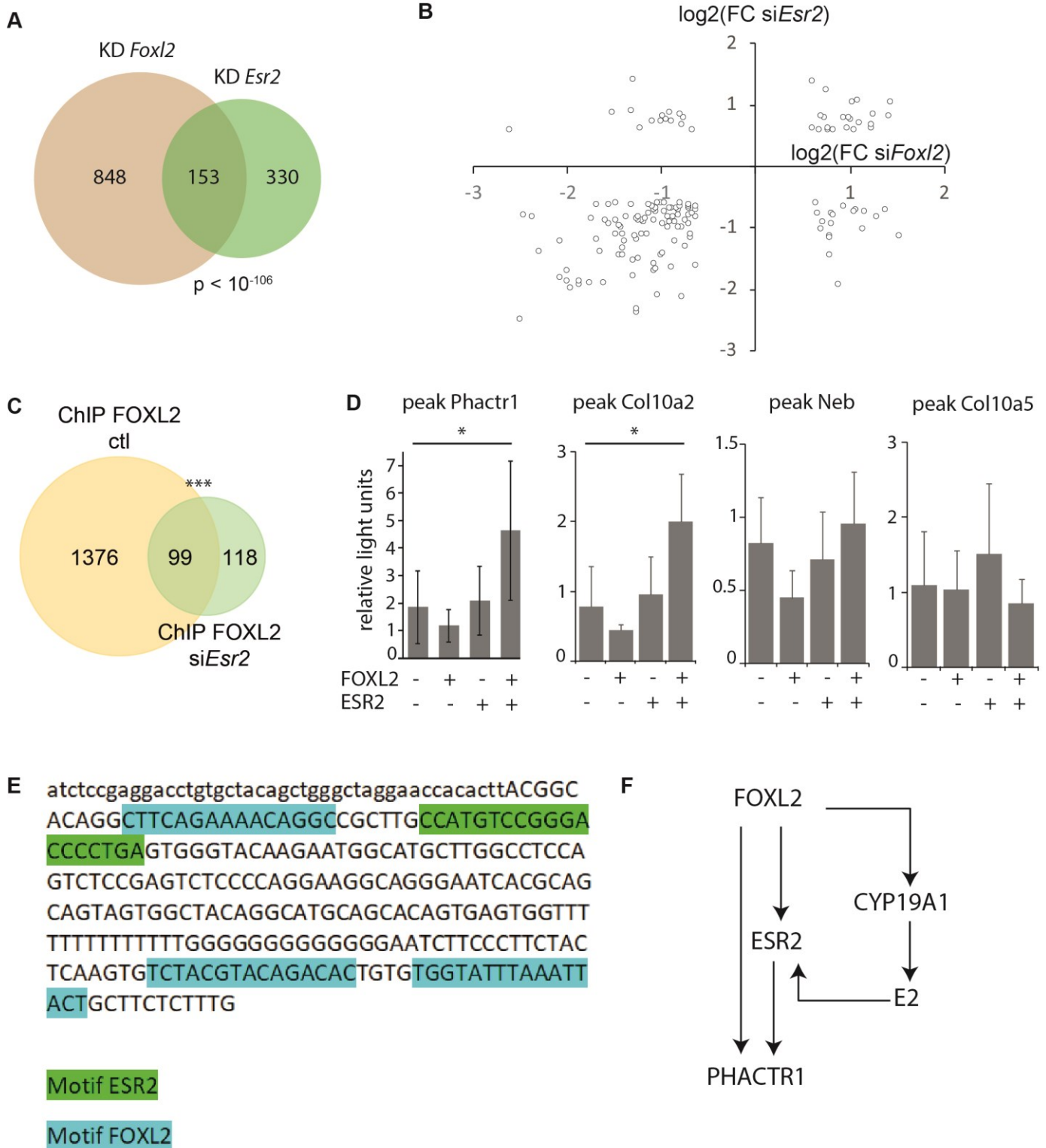
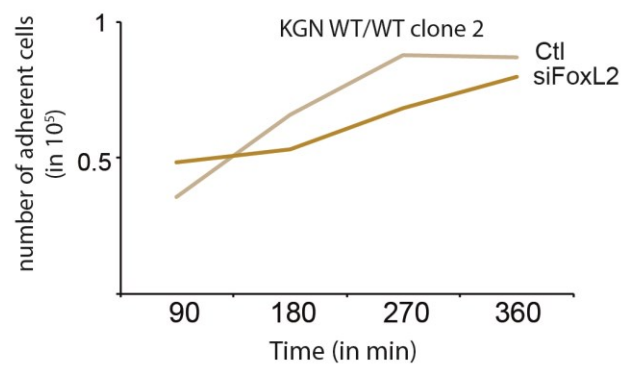
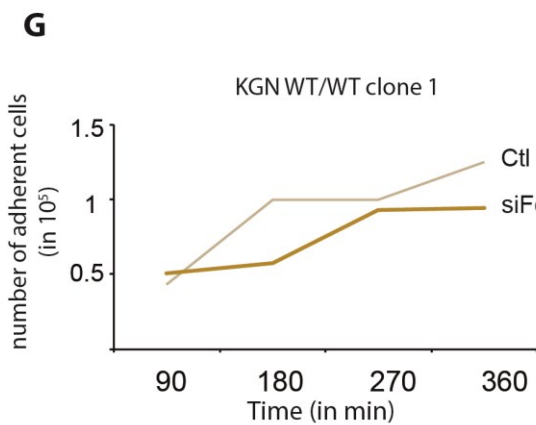
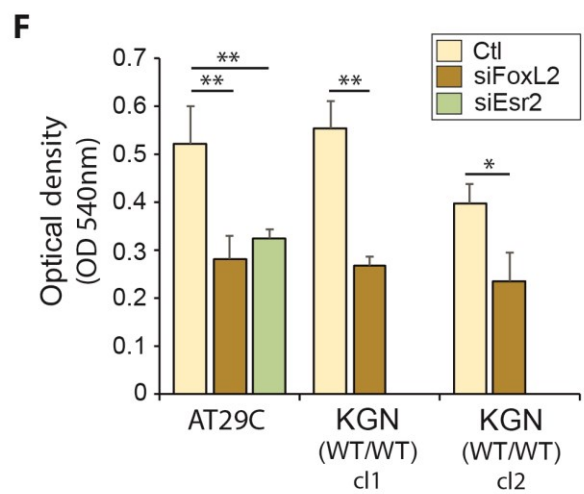
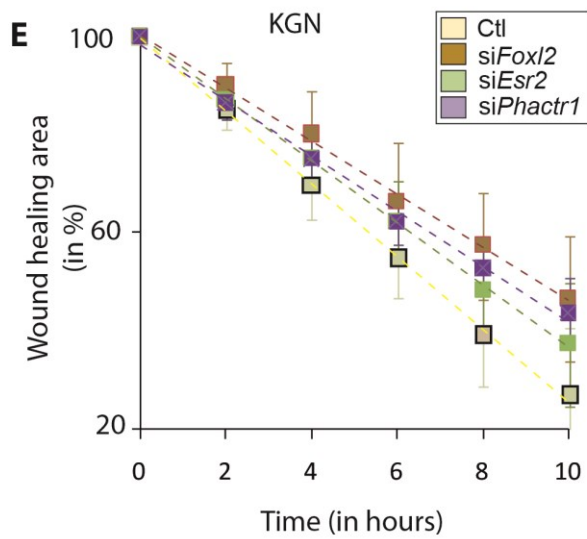
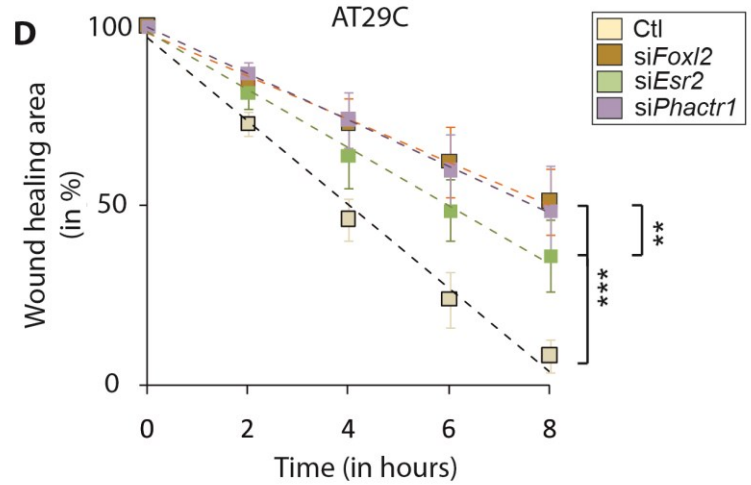
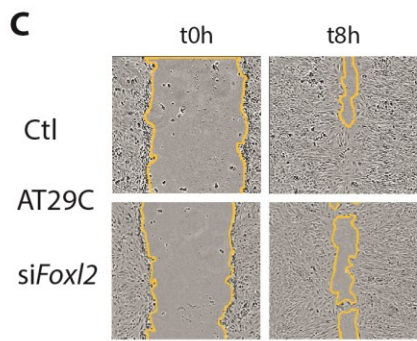
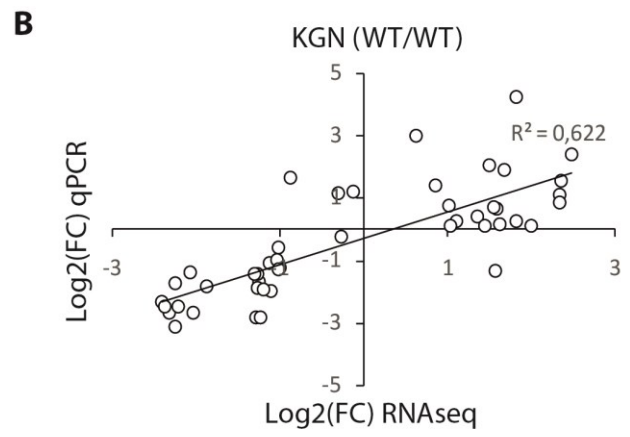
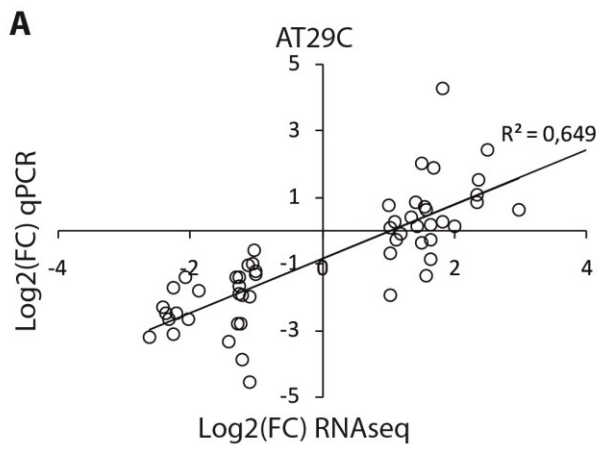


FIGURE 5



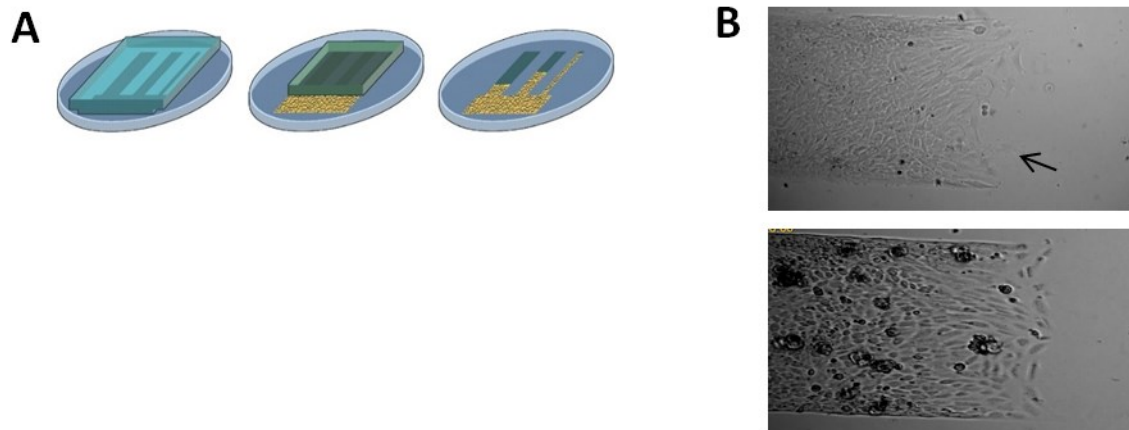


Figure 24 : **Migrations cellulaires sur rails de fibronectine**

A. Représentation schématique de la migration sur rail de fibronectine. Brièvement, un tampon de fibronectine est appliqué sur une lamelle en verre traité avec un agent hydrophobe. Les cellules sont ensemencées au début du rail qui est protégé par une barrière de PDMS, la barrière est levée et les cellules migrent.

B. Migration de KGN WT/WT contrôle ou traitées avec siFOXL2. Les cellules présentent une vitesse de migration similaire mais le comportement de migration est différent avec un front bien défini en condition siFOXL2 et une migration plus aléatoire en condition contrôle. On observe aussi la présence de protrusion cellulaire sur les cellules contrôles (flèche).

3. Résultats complémentaires et discussion de l'article 1

a) FOXL2, ESR2, PHACTR1 et la migration des cellules de la granulosa

Nous montrons dans l'article 1 que FOXL2 et ESR2 régulent la migration des cellules de la granulosa *via* une régulation de l'expression de *Phactr1*. Cette mise en évidence a été réalisée par blessure (scratch wound healing assay) de cellules à confluence. Ce type d'expériences permet de voir la réponse des cellules après un arrachage de cellules au centre d'un puit à confluence et la capacité qu'elles ont à recoloniser plus ou moins rapidement l'espace laissé ainsi vacant. Cependant si cela donne une réelle information sur la capacité qu'ont les cellules à migrer, cela laisse la porte ouverte à d'autres types d'interprétations. En effet, deux fronts de migrations s'opposant l'un à l'autre, la recolonisation de l'espace vacant peut être modulé par des sécrétions de facteurs dans le milieu ainsi que par l'interprétation de ce signal par les cellules opposées. Un moyen de tester cette hypothèse serait d'incuber les cellules post-scratch avec du milieu frais (ou non consommé) et du milieu déjà consommé par des cellules (contenant donc des facteurs de croissance, ...). Un autre effet limitant de cette expérience est la blessure en elle-même qui peut affecter la rapidité de la reprise de la migration suivant les différentes conditions. Un élément de réponse peut là être déjà apporté. En effet, nos cellules présentent une migration très linéaire sur 10h sans accélération à partir de 2h ce qui pourrait révéler une capacité différentielle entre cellules pour se remettre de la blessure infligée.

Pour répondre à ces interrogations et fournir un autre mode d'analyse de la migration de nos cellules, nous avons mis au point un test avec une barrière en PDMS (silicone élastomère) (sur lesquelles les cellules ne peuvent pas se fixer). Lorsque la barrière est retirée, il n'y a alors qu'un seul front de migration à suivre et les cellules ne sont pas abîmées. Cette technique permettrait une analyse de la migration plus propre, indépendante de potentiels signaux provenant du front de cellules opposé. Des tentatives sur différents substrats ont été réalisées (coating commercial, fibronectine) mais des mises au point sont encore nécessaires. Une autre technique consiste à suivre la migration des cellules sur rail de fibronectine notamment (Figure 24A). Avec cette technique, la vitesse de migration du clone KGN WT/WT n'est pas affectée mais la forme des cellules et l'organisation du front de migration sont différentes avec une présence de protrusions dans le contrôle par rapport à la condition *siFoxl2* (Figure 24B). Ces résultats sont très préliminaires. Ces expériences nécessitent d'être répétées afin de pouvoir analyser en profondeur les phénotypes et les comportements cellulaires obtenus.

b) FOXL2, TRIM28 et SMAD3 : rôles et régulations dans les cellules de la granulosa

i. SMAD3 et TRIM28 des partenaires privilégiés de FOXL2 ?

D'autres partenaires de FOXL2 sont connus pour être impliqués dans les processus ovariens et jouent un rôle dans les cellules de la granulosa.

Parmi ces partenaires on retrouve SMAD3 qui interagit directement avec FOXL2 (278). L'inactivation du gène *Smad3* entraîne une baisse de la prolifération des cellules de la granulosa des follicules pré-antraux et antraux. Le taux de FSH est lui augmenté montrant que ce phénotype n'est pas associé à une baisse de production de FSH par l'hypophyse mais propre à un mécanisme intrinsèque aux cellules de la granulosa. Ces résultats font de SMAD3 un partenaire de FOXL2 très intéressant à étudier dans la fonction de l'ovaire. D'un point de vue pathogénique, dans l'ovaire murin, la déficience d'une sous-unité de l'inhibine- α ou de SMAD1/5 entraîne la formation de tumeurs de cellules de la granulosa (GCT). Dans ces GCT murines, SMAD3 est régulée à la hausse et activée (*via* une phosphorylation) (294–296), suggérant un rôle de SMAD3 dans la pathogénie des GCT. De plus, la perte de l'expression de *Smad3* chez les souris déficientes en inhibine- α entraîne une progression atténuée de la GCT et une baisse de l'expression de CCND2 (294). Enfin, dans les lignées cellulaires GCT humaines, l'expression de SMAD3 est associée à une viabilité des cellules *via* la voie NF- κ B, qui à son tour régule à la hausse l'expression de SMAD3. Cette boucle de rétrocontrôle positive active la voie ERK1/2 augmentant la survie des cellules GCT (297). Toutes ces observations nous ont poussés à nous intéresser au rôle du couple FOXL2/SMAD3. Dans des conditions similaires à l'analyse du couple FOXL2/ESR2 ([article 1](#)), le KD de *Smad3* a été réalisé dans les cellules primaires de la granulosa et un RNAseq a été réalisé.

Un autre partenaire putatif de FOXL2 qui nous a paru intéressant est TRIM28. En 2017, Rahmoun *et al.* s'intéressent au rôle de SOX9 dans la détermination des cellules de Sertoli. Ils cherchent alors une signature génomique de la présence de SOX9 sur la chromatine dans des testicules foetaux, reliant ainsi cette signature à un code-barre génomique du sort des cellules de Sertoli fœtales (appelé Sertoli Cell Signature ou SCS). En partant de l'hypothèse que les facteurs nucléaires qui lient également les SCS pourraient fonctionner en interagissant avec SOX9, ils identifient TRIM28 comme nouveau partenaire de SOX9 dans les testicules fœtaux (298). TRIM28 est impliqué dans un grand nombre de processus principalement centrés sur la chromatine, incluant la réponse aux dommages de l'ADN, la réplication virale, la production de cytokines et la pluripotence des cellules souches. TRIM28 est considéré comme un co-represseur universel de l'activité

transcriptionnelle (détaillé dans (299)). Cependant le rôle de TRIM28 est plus complexe que la simple répression, en effet, il est décrit comme jouant un rôle dans la transcription elle-même en régulant son arrêt temporaire et sa reprise (300). De façon intéressante *Trim28* est fortement exprimé dans l'ovaire murin et particulièrement dans les cellules de la granulosa. En raison de son rôle dans la répression de la transcription, l'hypothèse a été faite que TRIM28 puisse participer à la répression de cibles transcriptionnelles impliquées dans la maintenance des cellules de la granulosa. A Montpellier, Francis Poulat (collaborateur) a réalisé le KO de *Trim28* chez des souris. Les ovaires de souris adultes KO pour *Trim28* présentent un phénotype anormal des cellules de la granulosa. En effet des clusters de cellules présentent une baisse d'expression de *Foxl2* associée à une hausse de l'expression de *Sox9*, montrant une perte de la répression du programme « mâle », similaire à ce qui est observé dans le KO de *Foxl2*. De plus, à 8 semaines, les cellules de la granulosa présentent un aspect « Sertoli-like ». Tous ces résultats suggèrent que comme FOXL2, TRIM28 joue un rôle dans le maintien de l'identité des cellules de l'ovaire. TRIM28 pourrait ainsi participer avec FOXL2 à la répression de la voie « mâle » dans l'ovaire.

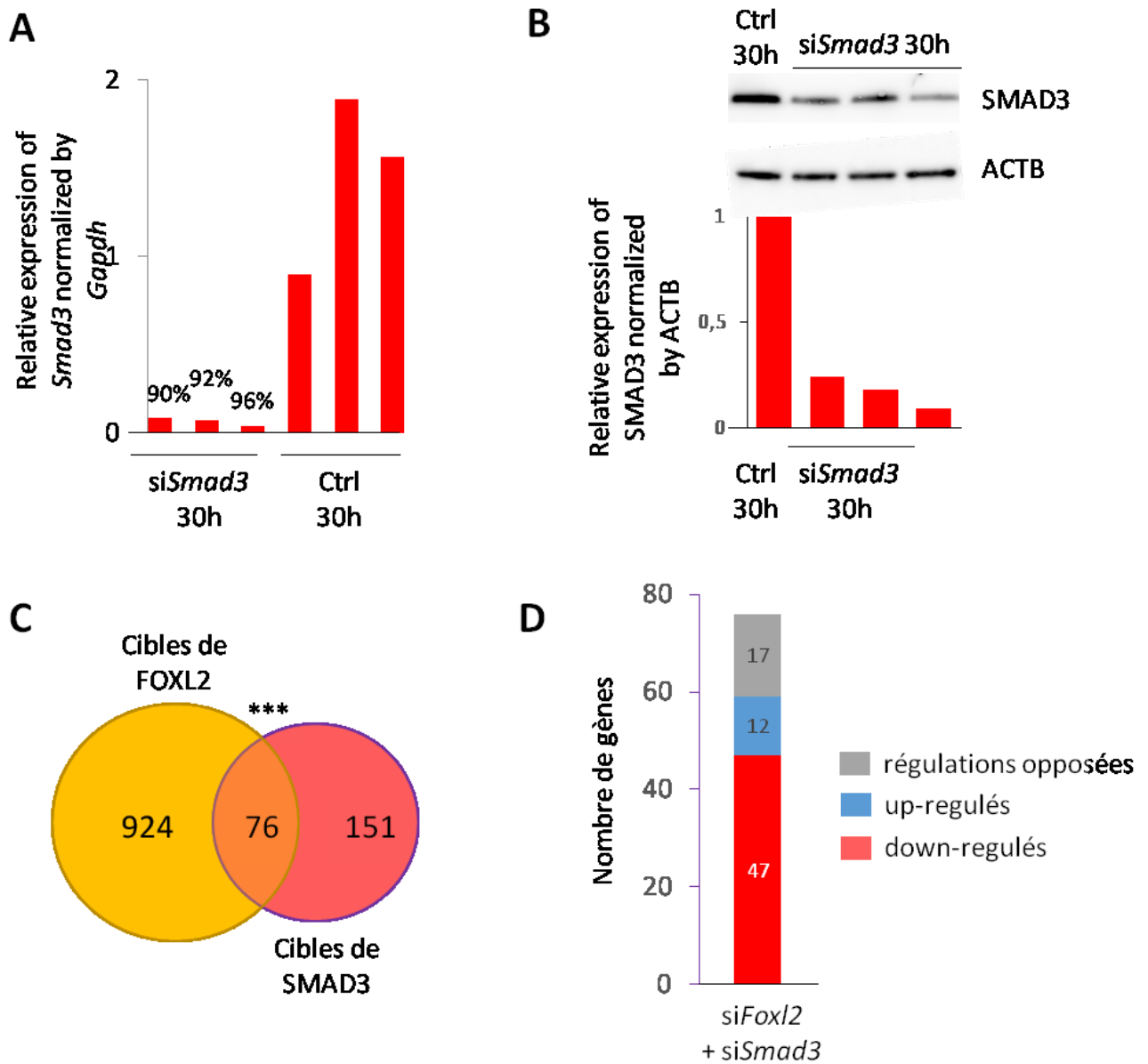


Figure 25 : **Knock-down de Smad3 en cellules de la granulosa et cibles communes avec FOXL2.**

A. Effet du KD de Smad3 mesuré en RT-qPCR. KD réalisé en triplicat avec trois pools différents de siRNA (comme décrit dans l'article 1).

B. Effet du KD de Smad3 mesuré au niveau protéique en WB. Le niveau d'expression de SMAD3 est normalisé par le niveau d'expression de l'Actine B.

C. Diagramme de Venn présentant les cibles communes identifiées dans le RNA-seq KD de Foxl2 et le RNA-seq KD de Smad3. ***<0,001, calculé par loi hypergéométrique.

D. Répartition en nombre de gènes des cibles régulées à la fois par FOXL2 et SMAD3.

ii. Analyses transcriptionnelles des effets de TRIM28 et SMAD3 en association avec FOXL2 sur les cellules de la granulosa

Le KD de *Smad3* a été réalisé par traitement siRNA. Au niveau ARN (Figure 25A) et au niveau protéique (Figure 25B) le traitement est efficace et est associé à une forte baisse de l'expression de *Smad3*.

L'analyse par RNA-seq des gènes DE (FC>1.5) dans le KD de *Smad3* montre que 227 gènes sont dérégulés. Environ trois quart des gènes sont down-régulés dans le KD de *Smad3* (172/227) associant SMAD3 à un effet plutôt activateur de la transcription. Les cellules n'ayant pas été traitées avec de l'activine, il s'agit de cibles régulées par l'activité basale de SMAD3 dans les cellules de la granulosa. Une analyse d'enrichissement par Reactome (2016) de tous les gènes DE montre un enrichissement attendu pour des gènes impliqués dans la signalisation *via* l'activine (p-value adj.= 0,016). D'autres voies, comme l'infertilité ovarienne ne sont pas enrichies statistiquement mais restent des pistes intéressantes à explorer.

Un croisement des 1001 cibles régulées directement ou indirectement par FOXL2 et des cibles de SMAD3 identifie 76 cibles communes (Figure 25C). Parmi ces cibles, une large majorité (47/76) sont down-régulées dans les deux KD, 12 sont up-régulées et 17 ne sont pas régulées de la même façon par FOXL2 et SMAD3 (Figure 25D). Ces résultats indiquent que le couple SMAD3/FOXL2 est principalement activateur de la transcription. Parmi ces gènes six sont associés à la voie de signalisation EGFR1 (Hsd11b2, Tgfb2, Mme, Map2, Itga2, Timp3 et Tuba8), voie impliquée dans la croissance, la différenciation, la migration et l'adhésion cellulaire en interaction avec d'autres voies de signalisation.

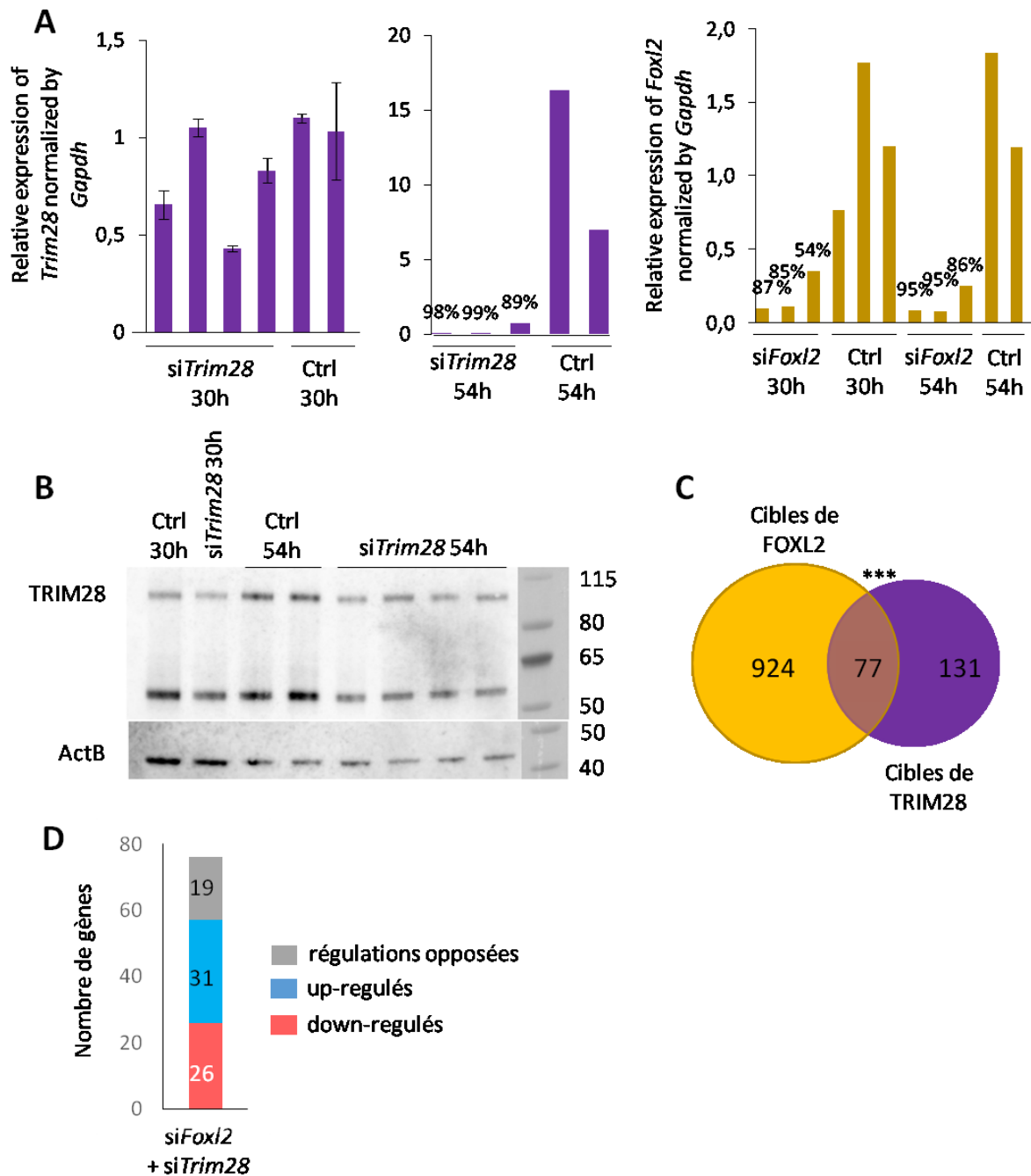


Figure 26 : **Knock-down de *Trim28* en cellules de la granulosa murine**

A. Effet des KD de *Trim28* et de *Foxl2* mesurés en RT-qPCR. KD réalisé avec quatre pools différents de siRNA (comme décrit dans l'article 1) pour le panel de gauche. KD réalisé en triplicat avec trois pools différents de siRNA avec deux transfusions indépendantes avec 24h d'intervalle pour réaliser un KD de 54h (panel central). KD réalisé en triplicat avec trois pools différents de siRNA avec une transfusion ou deux transfusions indépendantes avec 24h d'intervalle pour réaliser un KD de 54h (panel de droite).

B. Effet du KD de *Trim28* mesuré au niveau protéique en WB. L'actineB est présentée en témoin de charge.

C. Diagramme de Venn présentant les cibles communes identifiées dans le RNA-seq KD de *Foxl2* et le RNA-seq KD de *Trim28*. ***<0,001, calculé par loi hypergéométrique.

D. Répartition en nombre de gènes des cibles régulées à la fois par FOXL2 et TRIM28.

L'ARN *Trim28* et la protéine qui en résulte sont particulièrement stables dans le temps. Un KD de *Trim28* a été réalisé dans les conditions similaires aux KD de *Foxl2* et d'*Esr2* décrit dans [l'article 1](#) (Figure 26A). Le KD de 30h présente un effet très faible (Figure 26A panel gauche) alors que le KD de 54h est très efficace au niveau ARN (Figure 26A panel central). Le KD de *Foxl2* a été réalisé dans les mêmes conditions et l'effet KD déjà présent à 30 heures est amplifié à 54h de traitement siRNA (Figure 26A panel de droite). Au niveau protéique le KD de 54h est relativement efficace avec une réduction de la détection de Trim28 de l'ordre de 50% (Figure 26B).

Une analyse RNAseq des gènes DE (FC>1.5) dans le KD de *Trim28* montre que 208 gènes sont dérégulés par ce KD. Un tiers de ces gènes (78/208) sont up-régulés après KD montrant que l'effet plutôt répresseur de la transcription attribué à TRIM28 n'est pas forcément valable dans les cellules de la granulosa (299). Aucune voie de régulation particulière n'est retrouvée enrichie dans ce pool de gènes, démontrant un rôle potentiellement pléiotropique de TRIM28.

Un croisement des cibles identifiées comme régulées directement ou indirectement par FOXL2 (1001 cibles décrites dans le [papier 1](#)) et les cibles de TRIM28 (208 gènes) montrent que ces deux facteurs partagent 77 cibles (Figure 26C). Parmi ces cibles, 31 sont up-régulées à la fois par le KD de *Foxl2* et *Trim28*, 26 sont down-régulées dans les deux KD et 19 se comportent de façon inverse (Figure 26D). Ces résultats montrent que le couple FOXL2-TRIM28 a un effet assez bimodal sur la régulation de la transcription loin de l'effet purement répresseur souvent associé à TRIM28 (299).

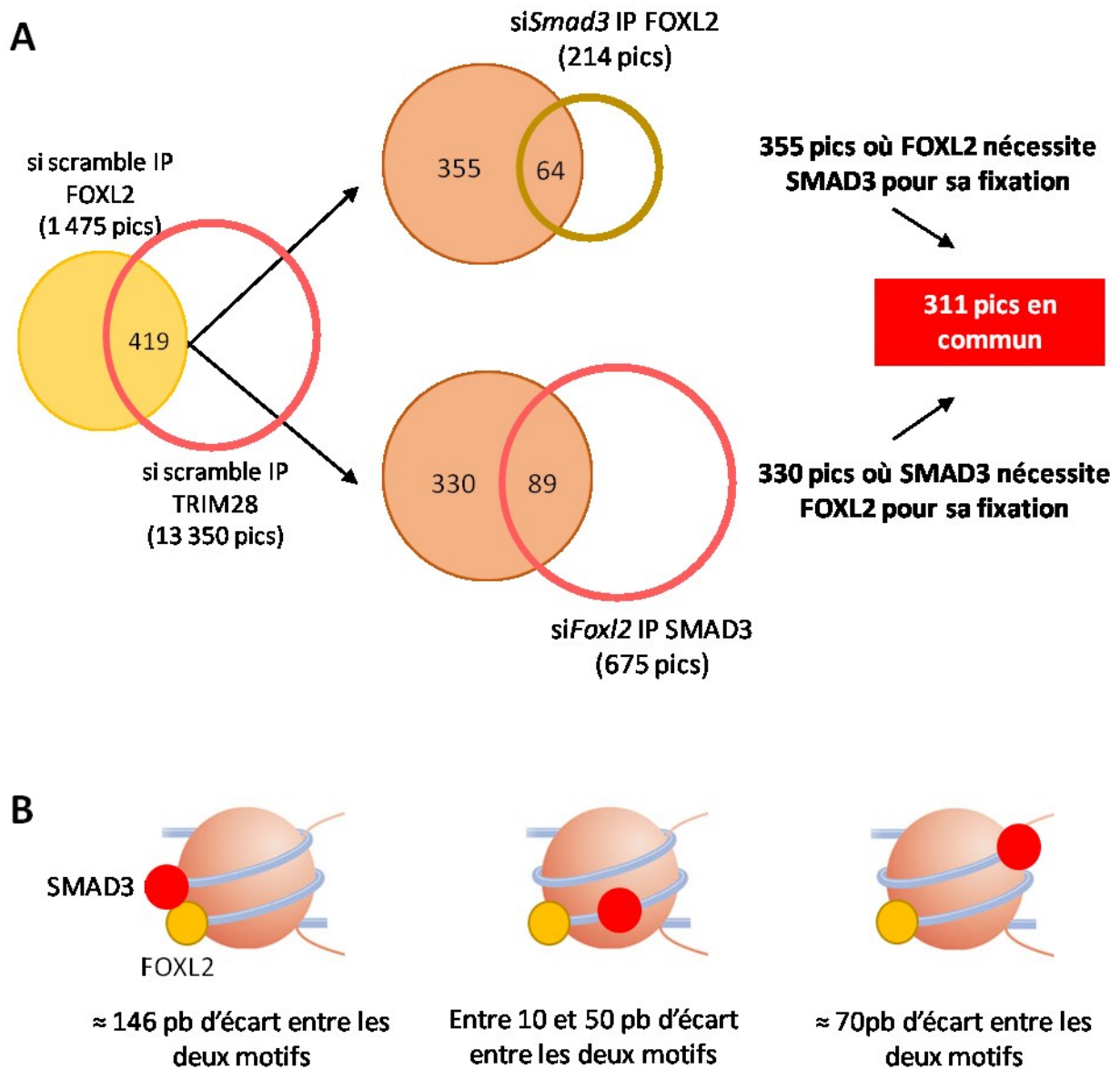


Figure 27 : Analyse de la fixation de SMAD3 et FOXL2 par CHIP-seq

A. A gauche, overlap entre les pics reconnus par FOXL2 et ceux reconnus par SMAD3 en condition contrôle. Au centre, croisement de 419 pics communs entre FOXL2 et SMAD3 avec les pics reconnus par FOXL2 en absence de Smad3 (haut) ou les pics reconnus par SMAD3 en absence de Foxl2 (bas). Identification de 311 pics (à droite) où les deux partenaires ont besoin l'un de l'autre pour fixer la chromatine.

B. Représentation hypothétique de l'interaction entre SMAD3 et FOXL2 suivant le nombre de paire de bases entre les deux motifs identifiés. Les hypothèses d'interaction les plus probables prennent en compte l'enroulement de la chromatine autour du nucléosome.

iii. Fixation sur la chromatine de TRIM28 et de SMAD3 dans les cellules de la granulosa

L'immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée pour FOXL2 et SMAD3. Dans les deux cas deux points ont été réalisés, l'un sur des cellules non-traitées (avec présence du partenaire), l'autre en condition KD pour le partenaire (ChIP-seq FOXL2 avec *siSmad3* et ChIP-seq SMAD3 avec *siFoxl2*). Dans un premier temps les pics identifiés comme étant reconnus par FOXL2 et SMAD3 ont été croisés pour obtenir 419 régions sur le génome reconnues par les deux facteurs. Puis ces 419 pics ont été croisés avec respectivement la ChIP-FOXL2 en absence de TRIM28 et la ChIP-TRIM28 en absence de FOXL2. Les régions dans l'overlap sont des régions toujours reconnues par le facteur même en absence de son partenaire (respectivement 287 et 61 pics) alors que 355 (en condition *siSmad3*) et 330 pics (en condition *siFoxl2*) ne sont plus reconnus sans le partenaire. Parmi ces pics pour lesquels FOXL2 nécessite SMAD3 pour sa fixation et inversement, 311 sont communs aux deux croisements et sont donc des régions reconnues par FOXL2 et SMAD3 probablement ensembles (Figure 27). Une analyse de motifs réalisée sur ces 311 pics a permis de mettre en évidence une prédominance d'une séquence répétée parmi ces pics pour lesquels le motif reconnu par FOXL2 et le motif reconnu par SMAD3 sont séparés de 19 à 21 pnb. Les autres pics identifiés possèdent également des motifs reconnus par FOXL2 et SMAD3 avec des écarts assez conservés. Trois conformations, présentées Figure 27B, sont particulièrement conservées et pourraient représenter une interaction entre les deux facteurs associés aux histones. Une étude plus poussée devrait être menée par clonage des pics en amont de gènes rapporteurs pour voir leur fonction dans la régulation de la transcription.

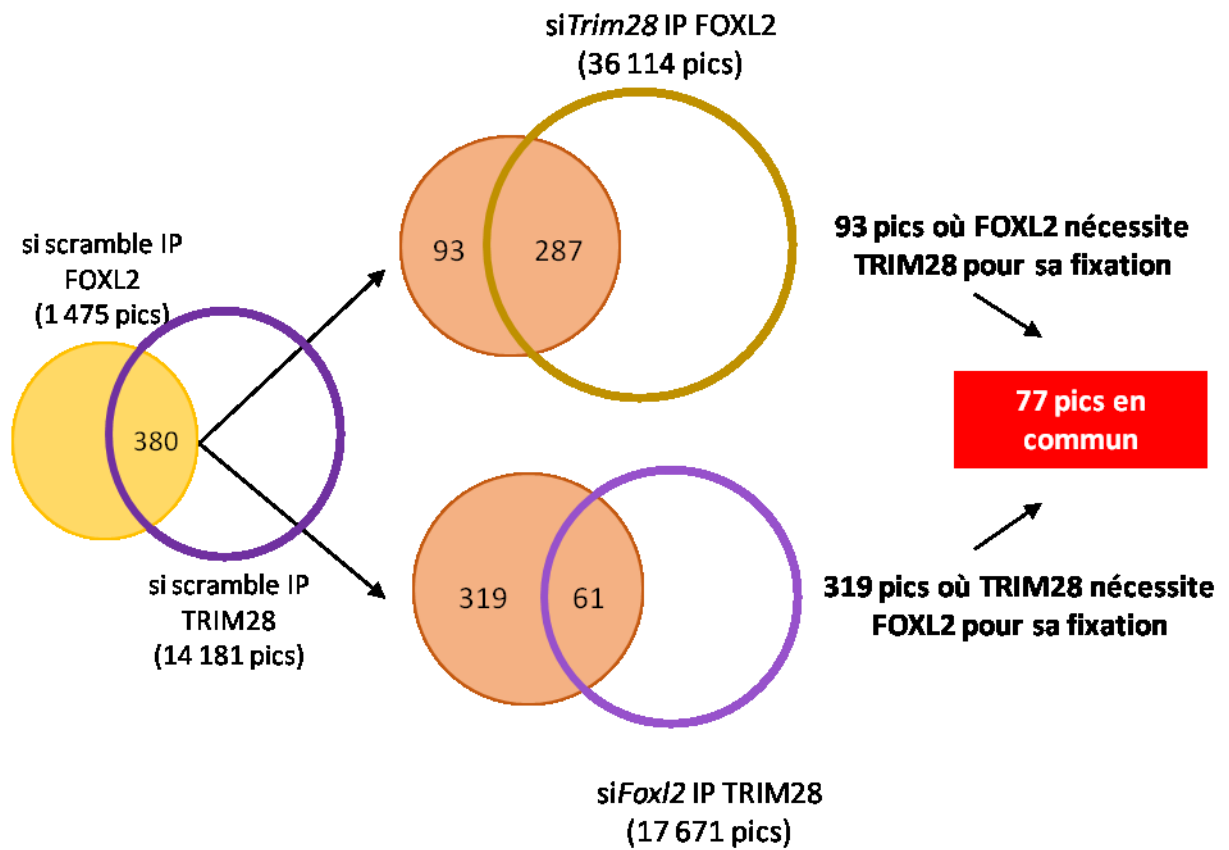


Figure 28 : Analyse de la fixation de FOXL2 et TRIM28 par CHIP-seq

A gauche, overlap entre les pics reconnus par FOXL2 et ceux reconnus par TRIM28 en condition contrôlée. Au centre, croisement de 380 pics communs entre FOXL2 et TRIM28 avec les pics reconnus par FOXL2 en absence de Trim28 (haut) ou les pics reconnus par TRIM28 en absence de Foxl2 (bas). Identification de 77 pics (à droite) où les deux partenaires ont besoin l'un de l'autre pour fixer la chromatine.

De la même façon, l'immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée pour FOXL2 et TRIM28 de façon indépendante. Dans les deux cas deux points ont été réalisés, l'un sur des cellules non-traitées (avec présence du partenaire), l'autre en condition KD pour le partenaire (ChIP-seq FOXL2 avec *siTrim28* et ChIP-seq TRIM28 avec *siFoxl2*). Dans un premier temps, les pics identifiés comme étant reconnus par FOXL2 et TRIM28 ont été croisés afin d'obtenir 380 régions sur le génome reconnues par les deux facteurs. Puis ces 380 pics ont été croisés avec respectivement la ChIP-FOXL2 en absence de TRIM28 et la ChIP-TRIM28 en absence de FOXL2. Les régions présentes dans l'overlap sont des régions toujours reconnues par le facteur même en absence de son partenaire (respectivement 287 et 61 pics) alors que 93 (en condition *siTrim28*) et 319 pics (en condition *siFoxl2*) ne sont plus reconnus sans le partenaire. Parmi ces pics où FOXL2 nécessite TRIM28 pour sa fixation et inversement, 77 sont communs aux deux croisements et sont donc des régions reconnues par FOXL2 et TRIM28 probablement ensembles (Figure 28).

iv. Co-régulation par FOXL2, SMAD3 et TRIM28

En suivant la méthodologie décrite dans l'[article 1](#), nous avons croisé les données de RNA-seq et de ChIP-seq en s'intéressant aux domaines topologiques où se trouvent une ou plusieurs régions potentiellement régulatrices (régions reconnues par FOXL2 et TRIM28) et un ou plusieurs gènes différentiellement régulés en condition KD *Foxl2* et *Trim28*. Il se trouve que seuls deux gènes DE se retrouvent dans un TAD avec une région régulatrice, *Aicda* (Activation Induced Cytidine Deaminase A) et *Rimklb* (Ribosomal Modification Protein Rim K Like Family Member B). Plus de gènes régulés uniquement par FOXL2 (22/77) se retrouvent dans cette configuration. Une analyse de ces gènes devrait être réalisée pour identifier des voies de signalisations communes entre FOXL2 et TRIM28.

En raison de la présence d'un grand nombre de séquences répétées dans les pics communs entre FOXL2 et SMAD3, ce genre d'analyse n'a pas été réalisée, car la qualité de la ChIP-seq et donc des pics obtenus n'est pas totalement convaincante.

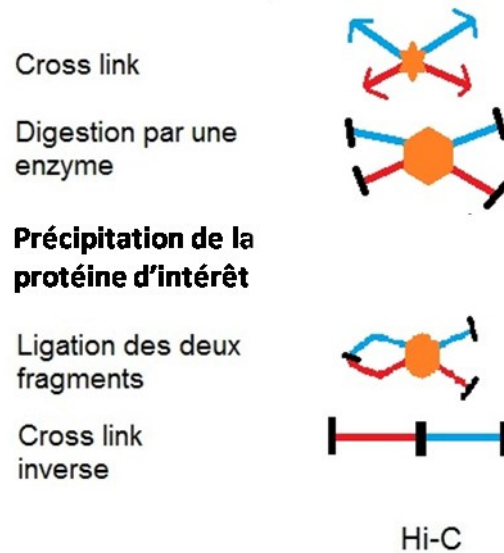


Figure 29 : Représentation schématique de la technique de Hi-C

La chromatine est cross-linkée afin de fixer les configurations protéiques (en orange) et chromatinienne (séquence 1 reconnue par la protéine en rouge et séquence 2 reconnue par la protéine en bleu). Puis une digestion enzymatique de la chromatine est réalisée pour obtenir des fragments cross-linkés à la protéine. La protéine d'intérêt est immunoprécipitée pour enrichir les fragments d'intérêt puis les deux fragments à proximité sont associés. La protéine est libérée et les fragments d'intérêt ainsi fusionnés sont séquencés.

v. Discussion et perspectives sur les couples de régulateurs

SMAD3 est un partenaire très intéressant de FOXL2. Nous nous attendions à ce qu'un grand nombre de gènes régulés par SMAD3 soit commun avec les gènes régulés par FOXL2. Cependant nous n'avons obtenu que peu de cibles co-régulées. Dans les cellules de la granulosa, l'expression de *Smad3* est dépendante d'une activation par l'activine A. Nos expériences de ChIP-seq et de RNA-seq sont donc réalisées sur un niveau d'expression basale de SMAD3. Cette faible expression pourrait expliquer les résultats un peu décevants concernant l'overlap entre les données de RNA-seq et de ChIP-seq. Néanmoins, les premiers résultats sont encourageants et poussent à continuer cette analyse du couple SMAD3/FOXL2 dans les cellules de la granulosa, potentiellement dans des conditions similaires mais avec traitement à l'Activine A avant la réalisation de la ChIP.

Pour l'étude de TRIM28, le facteur limitant a été l'obtention d'un KD de *Trim28* suffisant. La difficulté à l'obtenir pourrait expliquer à la fois, le peu de cibles identifiées de TRIM28 dans l'ovaire mais aussi le peu de pics FOXL2 affectés dans le cas du si*Trim28*. En effet il est probable que la présence d'une quantité de 50% de protéines TRIM28 fausse les résultats concernant les pics de FOXL2 affectés par la perte de TRIM28. Si le RNAseq montre que le KD de *Trim28* est relativement bon au niveau ARN avec un rapport de 3 entre l'expression au niveau du contrôle et l'expression en KD, le WB montre clairement que la protéine reste stable dans le temps.

b) FOXL2 et la conformation de la chromatine

L'[article 1](#) se base sur le fait que la chromatine est repliée sur elle-même formant des domaines topologiques (TAD) où l'ADN interagit avec lui-même. Notre analyse par ChIP-seq de fixation de FOXL2 a mis en évidence 1 475 régions où FOXL2 fixe la chromatine. Parmi ces pics un tiers (452/1 475) se fixent dans des TAD où un ou plusieurs gènes (402 gènes au total) ont été identifiés comme cible de FOXL2. Suite à ce résultat, il apparaît intéressant de regarder si FOXL2 pourrait induire la formation de boucles d'ADN par reconnaissance de plusieurs motifs entraînant un repliement de la chromatine sur elle-même. En alliant le 3C (Chromosome Conformation Capture) puis une immunoprécipitation de la chromatine avec FOXL2 et les techniques de séquençage à haut-débit, nous souhaiterions obtenir une librairie contenant des fragments d'ADN étant, à l'origine, issus de deux fragments spatialement proches dans le noyau (Figure 29). Cette approche d'HiC permettrait d'identifier les régions régulatrices fixées préférentiellement par FOXL2 et pourrait apporter un

niveau supérieur dans la compréhension de la régulation transcriptionnelle *via* FOXL2. En effet, à ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur ce sujet.

B. Nouveaux partenaires protéiques de FOXL2 et implication dans le splicing des ARNm

1. Introduction

L'article 2 rapporte la découverte de nouvelles protéines interagissant directement ou indirectement avec FOXL2. Une analyse de ces interactions a été réalisée à l'échelle du protéome en utilisant la co-immunoprécipitation dans les lignées cellulaires AT29c dérivées de la granulosa murine et alpha-T3 dérivées de l'hypophyse, avec trois anticorps ciblant soit les parties N-terminale, C-terminale ou le domaine forkhead de la protéine.

Un ensemble de 255 partenaires communs aux deux lignées cellulaires a été trouvé. Leur analyse a montré que nous avons co-précipité plusieurs complexes impliqués dans le traitement de l'ARNm, le remodelage de la chromatine, la réplication et la réparation de l'ADN. Les interactions (directes et/ou indirectes) avec des partenaires sélectionnés ont été confirmées à la paillasse, suggérant un rôle inattendu pour FOXL2 dans ces processus. Dans l'ensemble, cette analyse exhaustive de l'interactome de FOXL2 endogène met en lumière ses nombreux et divers interacteurs ainsi que ces rôles cellulaires non-conventionnels.

Parmi ces rôles non-conventionnels, le traitement de l'ARNm a particulièrement attiré notre attention. Pour obtenir un aperçu de l'impact fonctionnel du KD de FOXL2 sur l'épissage pré-ARNm dans les cellules primaires de granulosa de la souris, nous avons effectué une analyse d'épissage différentiel suite au séquençage des ARNs en conditions contrôle et en absence de *Foxl2* (siRNA) (RNAseq détaillé dans le papier 1). La comparaison des transcriptomes des cellules traitées avec les siRNAs ciblant FOXL2 (*siFoxl2*, 3 réplicats) et ceux traités avec le siRNA contrôle (*siSCR*, 3 réplicats) nous a permis de détecter 52 transcrits épissés différemment correspondant à 35 gènes distincts (changement de l'indice d'épissage > 2, p-value de l'indice d'épissage < 0,05) sans dérégulation au niveau de l'expression des gènes. Environ la moitié de ces événements alternatifs sont des événements inconnus (c'est-à-dire non décrits dans les bases de données), indiquant un mauvais épissage potentiel. Les exons terminaux alternatifs représentent 11,5 %, les cassettes d'exon et la rétention d'intron 5 % chacune, les sites d'épissage alternatifs accepteurs et donneurs 2 % chacun. Le reste des événements d'épissage concerne principalement un usage de premiers exons alternatifs (23%), liés à l'existence de promoteurs alternatifs, pour lesquels nous ne pouvons exclure un effet du

KD de *Foxl2* sur la sélection des promoteurs. Plusieurs exemples ainsi que les résultats résumés ici sont présentés dans l'article 2.

2) Article 2 : Conventional and unconventional interactions of the transcription factor FOXL2 uncovered by a proteome-wide analysis

May Penrad-Mobayed, Caroline Perrin, Laetitia Herman, Anne Laure Todeschini, Fabienne Nigon, Bertrand Cosson, Sandrine Caburet, Reiner A Veitia

The FASEB Journal. 2020 Jan; 34(1):571-587.

RESEARCH ARTICLE

Conventional and unconventional interactions of the transcription factor FOXL2 uncovered by a proteome-wide analysis

May Penrad-Mobayed¹ | Caroline Perrin¹ | Laetitia Herman¹ | Anne-Laure Todeschini¹ | Fabienne Nigon² | Bertrand Cosson² | Sandrine Caburet¹ | Reiner A. Veitia¹

¹Institut Jacques Monod, CNRS UMR7592, Université de Paris, Paris, France

²Epigenetics and Cell Fate, CNRS UMR7216, Université de Paris, Paris, France

Correspondence

Sandrine Caburet and Reiner A. Veitia, Institut Jacques Monod, CNRS UMR7592, Université de Paris, 15 rue Hélène Brion, Paris F-75013, France.

Email: sandrine.caburet@ijm.fr (S. C.) and reiner.veitia@ijm.fr (R. A. V.)

Funding information

Université de Paris; Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)

Abstract

Beyond the study of its transcriptional target genes, the identification of the various interactors of a transcription factor (TF) is crucial to understand its diverse cellular roles. We focused on FOXL2, a winged-helix forkhead TF important for ovarian development and maintenance. FOXL2 has been implicated in diverse cellular processes, including apoptosis, the control of cell cycle or the regulation of steroid hormone synthesis. To reliably identify partners of endogenous FOXL2, we performed a proteome-wide analysis using co-immunoprecipitation in the murine granulosa cell-derived AT29c and the pituitary-derived alpha-T3 cell lines, using three antibodies targeting different parts of the protein. Following a stringent selection of mass spectrometry data on the basis of identification reliability and protein enrichment, we identified a core set of 255 partners common to both cell lines. Their analysis showed that we could co-precipitate several complexes involved in mRNA processing, chromatin remodeling and DNA replication and repair. We further validated (direct and/or indirect) interactions with selected partners, suggesting an unexpected role for FOXL2 in those processes. Overall, this comprehensive analysis of the endogenous FOXL2 interactome sheds light on its numerous and diverse interactors and unconventional cellular roles.

KEYWORDS

DNA recombination and repair, protein-protein interaction, proteomics, mRNA splicing, RNA processing

1 | INTRODUCTION

The members of the family of winged-helix forkhead transcription factors (FOX) play a central role during development and in the adult organism. Their misregulation and/or mutations are responsible for a series of genetic conditions,

ranging from infertility to language and/or speech disorders and immunological defects. Besides, because of their central role in signaling pathways and in the regulation of homeostasis, somatic misregulation and/or mutation of FOX genes are also associated with cancer.¹

FOXL2 is a member of the FOX family and its germline mutations are responsible for the *Blepharophimosis*

Abbreviations: AGCT, adult-type granulosa cell tumor; BPES, blepharophimosis ptosis epicantus inversus syndrome; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; GO, gene ontology; IP, immunoprecipitation; LC-MS, liquid chromatography-mass spectrometry; MS, mass spectrometry; PBST, phosphate buffered saline-tween; RT-qPCR, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; Y2H, yeast two-hybrid.

Ptois Epicantus inversus Syndrome (BPES), characterized by palpebral abnormalities often associated with premature ovarian insufficiency.² A somatic missense mutation, namely c.402C→G (p.C134W) has also been reported in the vast majority of adult-type granulosa cell tumors (AGCTs).³ Constitutive knock-out mouse models recapitulate the BPES phenotype and display ovarian abnormalities such as early follicular depletion and ovarian failure.^{4,5} In contrast, a conditional knock-out (KO) in murine adult granulosa cells leads to their transdifferentiation into Sertoli-like cells and to a derepression of testicular markers.⁶ A goat model of XX individuals bearing biallelic FOXL2 mutations displays overt female-to-male sex reversal as well as eyelid agenesis.⁷ BPES in humans and the results obtained in animal models highlight the importance of *Foxl2* for the development and maintenance of ovarian identity and function.

FOXL2 seems to modulate seemingly unrelated pathways. Indeed, it has been linked to many processes such as apoptosis, the control of cell cycle or oxygen free radical detoxification.⁸ FOXL2 has also been involved in the regulation of steroid hormone synthesis by modulating the expression of Star and aromatase genes.^{9,10} However, the regulation of FOXL2 itself and the mechanisms by which it modulates the expression of its targets are not fully understood yet. Such mechanisms may involve post-transcriptional modifications and/or protein-protein interactions able to modify the activity and/or specificity of the transcriptional complexes involving FOXL2.¹¹

Several partners of FOXL2 have been described thus far. For example, FOXL2 interacts with the SUMO-conjugating enzyme UBC9 and E3 SUMO-protein ligase PIAS1,¹² which are involved in its SUMOylation. FOXL2 has also been reported to be phosphorylated by LATS1, a kinase involved in Hippo signaling.¹³

Regarding its transcriptional partners, FOXL2 is known to interact with SMAD3 (mothers against decapentaplegic homolog 3) to jointly coregulate the *Gnrhr* promoter.¹⁴ They also coregulate the expression of *Fsh-β*^{15,16} and *follistatin* genes.¹⁷ The Steroidogenic Factor 1 (SF1/NR5A1) also interacts with FOXL2, leading to an inhibition of SF1 binding to the promoter of *CYP17*.¹⁸ It is also known that the interaction of FOXL2 with the DEAD-box protein 20 (DDX20) enhances FOXL2 pro-apoptotic function.¹⁹ FOXL2 also binds to the estrogen receptor alpha (ESR1) and inhibits its transactivation in reporter assays,²⁰ and together, they also synergistically repress *Sox9* in vitro.⁶

To extend the known set of FOXL2-interacting proteins, we have previously performed a FOXL2 yeast-two-hybrid (Y2H) screening using an ovarian cDNA library. As a result, we were able to uncover ten FOXL2 partners, which were confirmed by co-immunoprecipitation in overexpression conditions (eg, CXXC4, CXXC5, CREM, GMEB1, NR2C1, SP100, RPLP1, BANF1, XRCC6 and SIRT1).²¹ Some of these partners were shown to modulate FOXL2 transactivating and pro-apoptotic

activities. Interestingly, SIRT1 is known to regulate FOXL2 itself^{22,23} and is a key player of DNA damage response, genome stability, stress response and senescence.²⁴ This bears a clear link with other partners such as XRCC6, also involved in DNA repair (²¹ and references therein). A recent proteomic analysis of tens of members of the Forkhead box (FOX) TF family using stably transfected human embryonic kidney cells 293 (HEK293) also pointed to many potential FOXL2 partners,²⁵ but did not study endogenous FOXL2.

Here, to gain insights into how FOXL2 is able to regulate diverse cellular processes, we searched for direct and indirect partners of endogenous FOXL2. To enhance reliability, we used a proteomic approach using two murine cell lines derived from the ovary and the pituitary, where FOXL2 is expressed at endogenous levels, and three antibodies targeting different parts of the protein. This is the first proteome-wide study on FOXL2 partners in endogenous conditions published to date.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Cell culture and immunoprecipitation

We used two murine cell lines that express FOXL2: the pituitary-derived alpha-T3-1 cells^{26,27} and the granulosa-like AT29C cells.^{22,28} Cells were grown in Dulbecco's modified eagle-F12 (DMEMF-12) medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen-Gibco). To identify the endogenous protein partners of FOXL2, we performed immunoprecipitation experiments using Dynabeads^R Protein A (Invitrogen) and three polyclonal rabbit antibodies against the N-terminal region (Nter), the C-terminal region (Cter)²⁹ or the forkhead domain (FKH)^{5,30} of the human FOXL2 protein. An irrelevant polyclonal antibody was used as a control (IR, cat # 12-370, Millipore). Cell lysates incubated with no antibody (B for beads only) were also used as control. Cells were lysed in Lysis Buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1% Triton X-100, pH 7.6) supplemented with protease inhibitors (Complete mini EDTA-free cocktail, Roche), phosphatase inhibitors (PhosSTOP, Roche). One milligram of protein from whole-cell lysates was incubated with either one of the three anti-FOXL2 antibodies or the irrelevant antibody with rotational mixing for 4 hours at 4°C. Twenty microliters was used for the three FOXL2 antibodies whose IgG concentration is unknown. Different amounts (from 1 to 2.5 μg) were used for incubation with the irrelevant antibody. The samples were added to tubes containing 20 μL of pre-washed Dynabeads Protein A with rotational mixing overnight at 4°C. After several washes, the target proteins/Dynabeads protein A-Ig complexes were processed either for tandem mass spectrometry or for immunoblotting assays.

2.2 | Tandem mass spectrometry, Liquid Chromatography-MS/MS acquisition

The IP beads were directly digested overnight at 37°C using sequencing grade trypsin (12.5 µg/mL; Promega, Madison, WI, USA) in 30 µL of 25 mmol/L NH₄HCO₃. The peptides were desalted using ZipTip C18 pipette tips (Pierce Thermo Scientific), eluted in 12 µL acetonitrile 70% (Fisher Scientific)/0.1% formic acid, vacuum centrifuged and resuspended in 12 µL of 0.1% formic acid. LC-MS/MS acquisition was performed with a 2-hour gradient as follows. All digests or protein extracts were analyzed using an Orbitrap Fusion Tribrid equipped with an EASY-Spray nanoelectrospray ion source and coupled to an Easy nano-LC Proxeon 1000 system (all devices are from Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Chromatographic separation of peptides was performed with the following parameters: Acclaim PepMap100 C18 pre-column (2 cm, 75 µm i.d., 3 µm, 100 Å), Pepmap-RSLC Proxeon C18 column (50 cm, 75 µm i.d., 2 µm, 100 Å), 300 nL/min flow, gradient rising from 95 % solvent A (water, 0.1% formic acid) to 35% solvent B (100% acetonitrile, 0.1% formic acid) in 120 minutes followed by column regeneration for 50 minutes. Peptides were analyzed in the Orbitrap cell, in full ion scan mode, at a resolution of 120 000 (at m/z 200), with a mass range of m/z 350-1550 and an AGC target of 4 × 10⁵. Fragments were obtained by higher-energy C-trap dissociation (HCD) activation with a collisional energy of 30%, and a quadrupole isolation window of 1.6 Da. MS/MS data were acquired in the ion trap in a top-speed mode, with a total cycle of 3 seconds with an AGC target of 1 × 10⁴. The maximum ion accumulation times were set to 100 ms for MS acquisition and 35 ms for MS/MS acquisition in parallelization mode. All MS/MS data were processed with an in-house Mascot search server (Matrix Science, Boston, MA; version 2.4.1) using Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Scientific). The mass tolerance was set to 6 ppm for precursor ions and 0.5 Da for fragments. The maximum number of missed cleavages by trypsin was limited to two for all proteases used. MS/MS data were searched against a Human or Mouse Uniprot Database.

2.3 | Bioinformatic analyses of the MS data

MS identified 2400 proteins as potential partners for Foxl2. The quality scores ranged from 13 to 9794, with a mean of 93. As it is a phred-scaled score, we used a threshold of 30 (theoretically corresponding to a $P = .001$) to filter out low-quality proteins. The enrichment of a protein in the IP samples was calculated as the ratio between its mean abundance in the five IP samples for each cell line (expressed in Log₂) and its mean abundance in the three controls in the same cell line. The ratio ranged from 0.1 to 25.4, with a threshold at 15 when proteins were ranked. Only the proteins with a ratio

over 15 were kept as correctly enriched in the IP samples (ie, corresponding to a $2^{15} = 32\,768$ fold enrichment in samples). For filtering contaminants, CRAPome base v 1.0 for *Homo sapiens* was retrieved from reprint-apms.org and used to associate a total spectral counts over 343 control conditions from affinity purification MS experiments. The total spectral counts ranged from 0 (not found in the CRAPome database) to 11471. The threshold was defined as the spectral count obtained for the highest-ranking reliable FOXL2 partner, ie, one identified by two independent experiments. This is RBMX, included in the High-Confidence dataset from Li et al.,²⁵ that has a spectral count of 1045. The 22 proteins with a spectral count above 1045 were considered as contaminants, as well as 4 additional keratins with spectral counts below the threshold. The remaining 863 proteins were classified according to their specificity (found in one or both cell lines), their recurrence (identified in 1 to 10 IP samples) and their independent identification in other studies (our previous yeast two-hybrid assay and the high-throughput MS study by Li et al.²⁵). The significance of the overlap with the data from Li et al. was calculated with a hypergeometric test, using a total number of 4063 proteins identified by LC-MS/MS in an in-house non-IP experiment in AT29C cells using the same equipment.

The network was constructed using the GeneMania web tool (genemania.org) and keeping only protein-protein interactions, using the official names for the human orthologues, as more nodes and interactions were retrieved using human names than murine ones (763 connected nodes with 4312 interactions vs 259 connected nodes with 264 interactions, respectively). The network was uploaded and analyzed using Cytoscape 3.7.1. The known complexes and biological processes were identified with the Golorise and BiNGO plugins in Cytoscape, using an hypergeometric test and a P threshold of 0.05 after a multiple testing Benjamini & Hochberg FDR correction for over-representation, over the whole annotation as reference set. The complexes automatically identified as statistically significantly enriched were compared to the CORUM core complexes (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/corum/>, version 2, July 2017 Release) and completed with proteins present in our list, if relevant. The network layout was modified manually for clarity. For Figure 2, the network was simplified by keeping only nodes corresponding to proteins with Levels 1 and 2 (found in both cell lines, with at least 2 positive IP samples in each cell line, or found in 3 IP samples but confirmed in our previous Y2H). The network was further simplified by removing the complexes we could not confirm by IP + immunoblots (such as ribosome and mitoribosome). A complete network with the 862 partners is provided in Figure S1. Gene set enrichment analysis was performed with Enrichr (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>)³¹ using the list of 256 proteins, and retrieving enriched Biological pathways GO terms (complete results in Table S2). For analysis of differential binding of complexes by IP

with the three anti-FOXL2 antibodies, we observed that the IP with the anti-Nter antibody was roughly three times more efficient than the IPs with the two other antibodies. Therefore, we normalized the total abundances of each partner (in the complete list of 863 proteins) for IPs with each antibody on the abundance of FOXL2 for the same IP, in order to obtain normalized abundances corresponding to an equivalent efficiency for the 3 IPs (ie, 500 000 000 for each antibody). The relative contribution of each IP was then expressed as percentage of the total normalized abundance for each partner (See Table S1 for complete results). For Figure 4, we kept only the subunits with one IP contributing more than 50% of the normalized total abundance. The complete table of statistically enriched complexes is presented in Table S3.

2.4 | Isolation of mitochondria and purification of mitoplasts

Cells were collected using centrifugation and resuspended in ice-cold Isolation Buffer (250 mM Sucrose, 10 mM Tris-HCl pH7.4, 1 mM EDTA). The cells were homogenized by 40 strokes in a pre-chilled Dounce homogenizer (Kontes). Homogenized samples (TL*) were centrifuged twice at 800 *g* for 10 minutes to collect the postnuclear supernatant (S8), (Nuc = pellet: nuclear pellet and cellular debris). Mitochondria (M) were sedimented at 13 000 *g* for 10 minutes, and washed in the same buffer twice at 13 000 *g* for 10 minutes (S13.1 & S13.2).

2.5 | Immunoblot assays (western blotting)

The target proteins/Dynabeads protein A-Ig complexes were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis using NuPage Bis-Tris 10% or 4%-12% gels and 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid-sodium dodecyl sulfate Running Buffer (Invitrogen). Proteins were electrotransferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes using iBlot 2 Drying Blotting System (Life technologies). After pre-treatment for 1 hour at room temperature with 5% non-fat dry milk in phosphate buffered saline-tween (PBST, 0.1% Tween 20, 0.115M NaCl in 200 mM Tris), membranes were incubated overnight with the relevant primary antibody. After washing in PBST, membranes were incubated for 1 hour with either an HRP-conjugated goat anti-rabbit or a HRP-conjugated rabbit anti-mouse (Jackson ImmunoResearch) diluted to 1:10 000 in PBST with 5% non-fat dry milk, then washed in PBST. Detection was performed using the electrochemiluminescence (ECL) « SuperSignal West Femto » (Thermo Scientific). Membranes were scanned with the LAS-4000 imaging system (FUJI). The primary antibodies used against the candidate partners were the rabbit polyclonal antibodies: anti-HNRNPUL2 (1:1000, Abcam),

anti-KDM1A (LSD1) (1:500, ThermoFisher Scientific), anti-SDHA (succinate dehydrogenase, 1:1000#5839, Cell Signaling Technology, Inc); or the mouse monoclonal antibodies: anti-RFC5 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc.); anti-SF3A2 (SAP 62) (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc.); anti-SMARCB1(Ini1) (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Inc.); anti-SUPT16H (SPT16) (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc.); anti-CPSF4 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

2.6 | Differential splicing upon FOXL2 knockdown in cultured primary granulosa cells

Primary murine granulosa cells were collected from ovaries of 8-week-old female Swiss mice (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, France) and cultured as described.³² Cells were transiently transfected in 6-well plates with 30 pmoles of a pool of three different siRNAs against *FOXL2* (Dharmacon, Lafayette, Colorado, USA; ON-TARGETplus siRNAs, pool KD1: J-043309-09, J-043309-10, J-043309-11 and KD2: J-043309-09, J-043309-10, J-043309-12 or an equal amount of the non-targeting/scrambled siRNA (Dharmacon, D-001810-10-05) using Lipofectamine RNAiMax (Thermo Fisher Scientific). Six hours after transfection, the mixture was replaced with culture medium and cells were allowed to grow for 24 hours or 48 hours before performing subsequent experiments. The knockdown (KD) efficiencies were evaluated using reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). RNA extraction was performed as described above. cDNA synthesis was performed with 1 µg of total RNAs after DNase treatment (New England Biolabs, Evry, France), using the M-MLV RT enzyme according to the manufacturer's protocol (Thermo Fisher Scientific). RT-qPCR was performed using the GoTaq qPCR Master Mix 5X (Promega, Madison, Wisconsin, USA) in the Stratagene Mx3000P qPCR System. ActinB served as the reference gene. The results were analyzed and presented with Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA).

RNA extraction for RNA sequencing (RNA-seq) was performed 30 hours or 54 hours after transfection, following the TRI-reagent supplier's instructions (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio, USA). Total RNA (1.3 µg) underwent high-throughput sequencing at the IMAGIF platform (<https://www.i2bc.paris-saclay.fr/>, Gif-sur-Yvette, France). Total RNA quality was assessed on an Agilent Bioanalyzer 2100, using RNA 6000 pico kit (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Directional RNA-Seq Libraries were constructed using the TruSeq mRNA Stranded library prep kit (Illumina, San Diego, California, USA), following the manufacturer's instructions. Final library quality was assessed on an Agilent Bioanalyzer 2100, using an Agilent High Sensitivity DNA Kit. Libraries were pooled in equimolar proportions and sequenced on Single Read 75 pb runs, on an Illumina NextSeq500 instrument, using NextSeq 500 High Output 75

cycles kits. Demultiplexing was performed using bcl2fastq2 V2.15.0 and adaptors were removed with Cutadapt1.9.1. Only reads longer than 10bp were kept for analysis (about 10 000 000 reads per sample). Reads were mapped on the mouse genome (MM10) with TopHat2. Mapped reads were assigned to features with *features count* (1.5.0-p2).

RNA-seq data analysis was performed by GenoSplice (www.genosplice.com). Sequencing, data quality, reads reparation and insert size estimation were performed using FastQC, Picard-Tools, Samtools and rseqc. Reads were mapped using STARv2.4.0. Gene expression was estimated as already described³³ using Mouse FAST DB v2016_1 annotations. Genes were considered as expressed if their fpkm value was greater than the background fpkm value based on intergenic regions. Only genes expressed in either siFOXL2 or siScramble (siSCR) conditions were further analyzed. Analysis at the splicing level was first performed taking into account only exon or retained intron reads and flanking exon-exon junction reads, normalized by gene-wide exonic reads (“EXON” analysis) to detect potentially new alternative events that could be differentially regulated (ie, without taking into account known events). A complementary analysis was also performed by taking into account exon or intron reads plus junction and exclusion junction reads normalized by the relevant flanking exons to assess known splicing patterns (“PATTERN” analysis) using the FAST DB splicing annotation. All types of alternative events were analyzed: alternative first exons, alternative terminal exons, cassette exon, mutually exclusive exons, alternative 5' donor splice site, alternative 3' acceptor splice sites, intron retention, internal exon deletion and complex events corresponding to mix of several alternative event categories). Quantification of the “EXON” and “PATTERN” analyses was based on the splicing index calculation, as described previously.^{34,35} Results were considered statistically significant for P -values $\leq .05$ and fold-changes ≥ 1.5 . Events appearing at less than 10% of the expression of “classical events” were removed from the list by manual inspection.

3 | RESULTS

To discover novel FOXL2 protein partners, we performed a proteomic study using co-immunoprecipitation of the endogenous protein in two murine cell lines. Our approach avoids potential false positive results stemming from spurious interactions due to protein overexpression, frequently observed when using transfected cells. We used the granulosa cell AT29c and the pituitary-derived alpha-T3 cell models. AT29c cells are derived from granulosa cell tumors produced from transgenic mice expressing AT-t, which encodes the oncogenic large T antigen from SV40 virus. They express several granulosa cell markers such as SF1, WT1, AMHR11, as well as cytochrome P450scc and SGP2.²⁸ Alpha T3-1 cells

are a GnRH-responsive pituitary cell line belonging to the gonadotrope lineage. As mentioned above, they were derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. The response of such cells to GnRH is similar to that of primary pituitary gonadotropes, indicating their utility as a model system for the study of gonadotropes.^{26,27} Co-immunoprecipitation experiments were performed with three different antibodies directed against the N-terminal (Nter) region, the C-terminal region (Cter) or the forkhead domain (Fkd) of the human FOXL2 protein. Control conditions included immunoprecipitation using an irrelevant polyclonal antibody (IR) and/or beads (B) with no antibody.

The co-IP experiments were performed twice, independently for each cell line, and the precipitated complexes were identified using Mass Spectrometry (MS). Therefore, for each cell line we had a total of five co-IP samples (ie, with different anti-FOXL2 antibodies) and three control conditions (Figure 1A). We filtered the 2400 identified proteins based on reliability, enrichment and specificity (Figure 1B). First, we removed the proteins identified with a quality score below 30 in all co-IP samples. We then focused on the enrichment in the co-IP samples compared to control conditions. In order to define a pertinent threshold, we computed for each cell line the ratio of the log2 mean abundances of the identified proteins in the samples over their log2 mean abundances in the corresponding controls. As shown in Figure 1C, a clear threshold appeared, allowing us to objectively select 889 enriched proteins. Subsequently, to remove potential contaminants, we used the CRAPome database, which contains a compilation of proteins frequently identified in affinity purification MS controls.³⁶ To define a correct threshold for considering a protein as a contaminant, we used also data produced by the high-throughput MS study, obtained in HEK 293 cells overexpressing human forkhead factors.²⁵ In this study, Li et al. performed tandem affinity purification of FOXL2 (among other TFs) followed by MS, and identified 537 human FOXL2 partners, 52 of which are considered as High-Confidence interactors. The protein in common between our data and the High-Confidence set from Li et al. with the highest spectral counts in CRAPome database was RBMX (1045 counts). Therefore, we considered that any protein in our data with a CRAPome spectral count over 1045 was too abundant in MS controls to be considered as reliable. With the addition of 4 keratins, this step identified 26 contaminants, yielding a final dataset of 863 proteins (Table S1).

To focus on the most reliable common partners, we classified the 863 proteins on the basis of their cell-type specificity (proteins found in one or both cell lines), the number of positive co-IP samples (proteins identified in 1 to 10 co-IP samples) and on their identification by independent assays (our previous Y2H assay or the high-throughput MS study by Li et al.). Amid the 863 proteins, we extracted a core set of 245 highly reliable interactors identified at least twice in

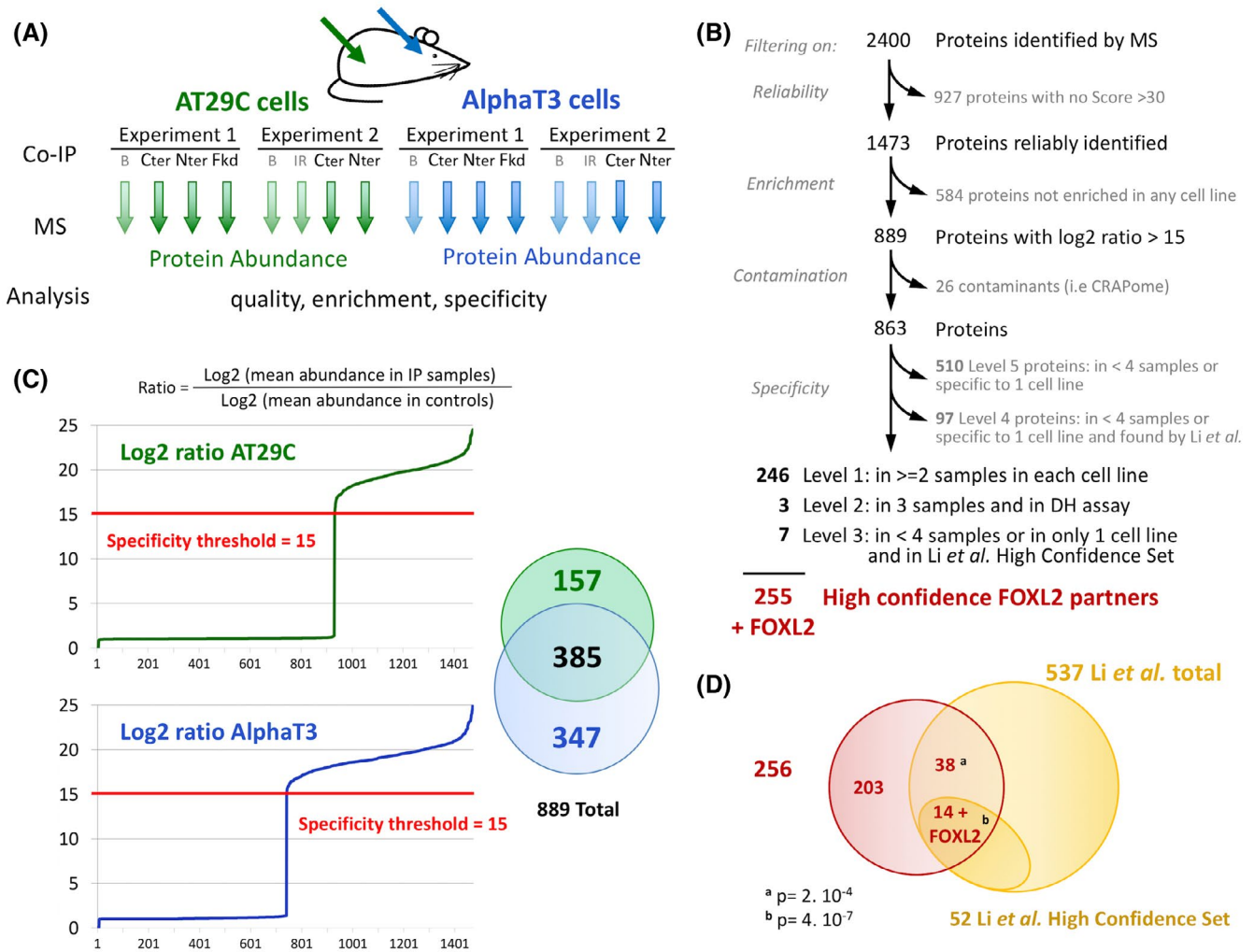


FIGURE 1 Analysis of endogenous Foxl2 interactors by co-immunoprecipitation and mass spectrometry. A, Experimental procedure for the identification of Foxl2 interacting proteins in two murine cell lines, using two independent experiments and three different anti-FOXL2 antibodies, against its N-terminal (Nter) region, its C-terminal region (Cter) or its forkhead domain (Fkd). The control IPs used either an irrelevant antibody (IR) or beads without antibody (B). B, Analysis workflow for the filtering of MS data. The final dataset of 863 proteins is divided into five levels of reliability, with a core dataset of 255 partners that combine several lines of evidence. C, Plot of the identified proteins according to their ratio of Log₂ mean abundance in IP samples over Log₂ abundance in control samples, for each cell line, showing the clear threshold used for enrichment definition. The Venn diagram shows the distribution between the two cell lines of the 889 proteins with a ratio above 15. D, Overlap of the resulting core set of 256 proteins (including FOXL2) with the proteins identified by the high-throughput MS study by Li et al. The significance of the overlap is given for the total overlap (53 proteins) and the one restricted to the High-Confidence set of Li et al. (15 proteins) as provided by an hypergeometric test

each cell line (labeled as Level 1 partners in Table S1). We also kept 3 additional proteins that were identified in only 3 of our 10 co-IP samples but that were known from our previous Y2H assay and confirmed by co-IP and immunoblot (Level 2). Similarly, we kept 7 proteins identified in less than 4 samples or in only one cell line but that also belong to the High-Confidence set from Li et al. (Level 3). A further set of 97 proteins were identified in less than four samples or in only one cell line in our study, but were also found in common with the MS data of Li et al. (albeit not in the High-Confidence set), and can be considered as potentially reliable

(Level 4). Finally, 510 proteins were identified in only one cell line or in less than 4 samples, reducing their interest as FOXL2 general interactors (Level 5).

This analysis produced a list of 255 high-confidence FOXL2 partners (Levels 1-3), for the most part common to both cell lines (Table S1). Our final dataset has a significant overlap with the dataset of Li et al., as 53 proteins are found in common in both studies (Figure 1D, 52 partners + FOXL2, $P = 2 \times 10^{-4}$, hypergeometric test).

To get insights into the pathways and complexes involving FOXL2 and its partners, we performed a bioinformatic

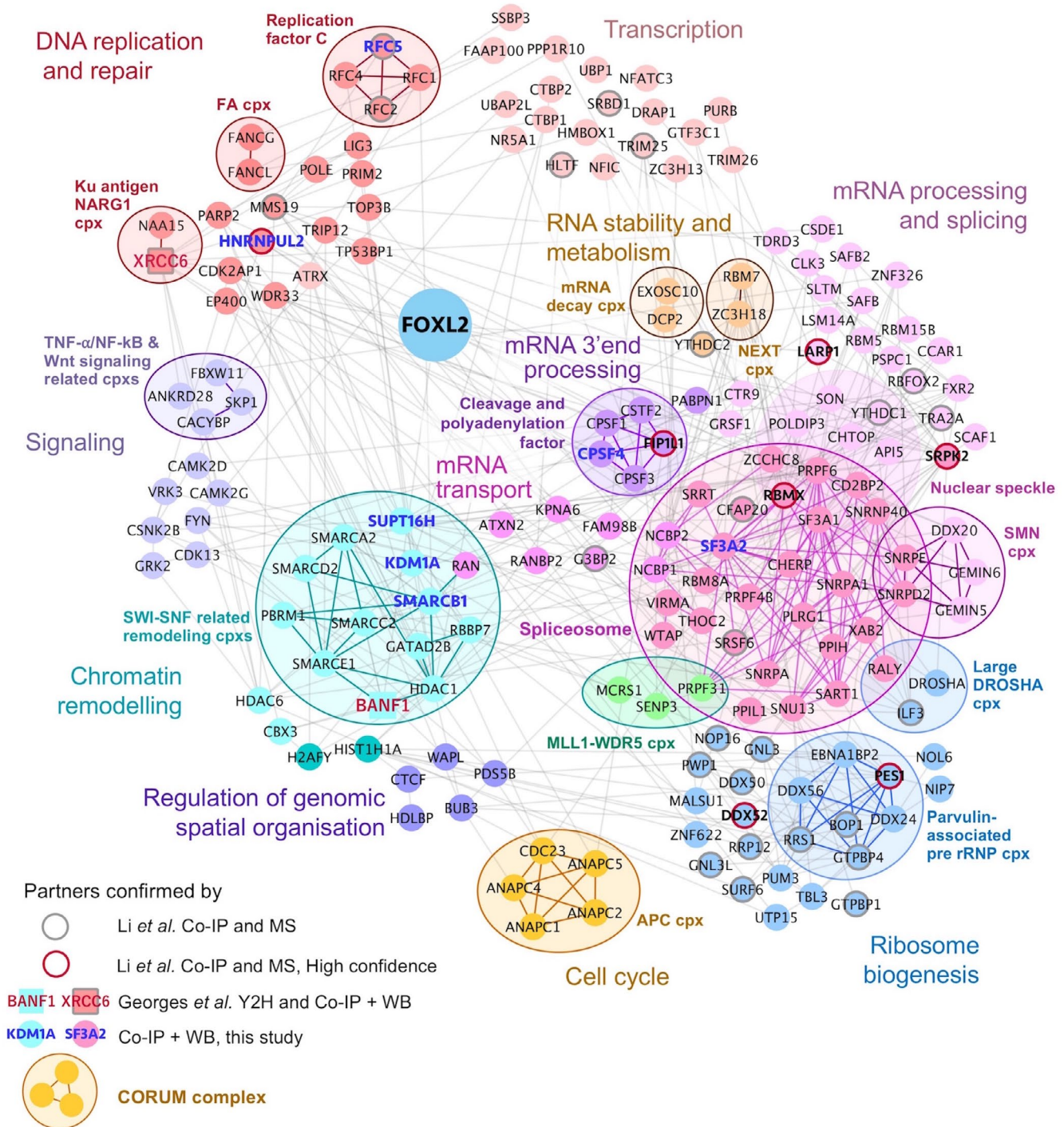


FIGURE 2 FOXL2 interactome: protein-protein interactions network for the core set of 255 FOXL2 partners identified by MS. The interactions between FOXL2 partners were retrieved using GeneMania and analyzed within Cytoscape 3.7.1. The nodes were clustered with the Golorise and BiNGO plugins, and colored according to enriched biological processes and GO terms. Statistically enriched complexes identified with Golorise and BiNGO were verified in the CORUM core complex database, and are delineated by colored circles, with colored edges displaying known interactions between subunits within a complex. Highlighted partners were confirmed independently, by co-IP and MS by Li *et al.* (in their complete dataset: gray border; in their high-confidence dataset: red border and bold label), by George *et al.* (yeast two-hybrid and co-IP + WB, bold red label), or this study (co-IP + WB, bold blue label). The statistically enriched location to nuclear speckles is also shown as a non-circled colored background

analysis of these 256 proteins. We generated a protein-protein interaction network and combined it with a gene set enrichment analysis (Figures 2-4). For statistically enriched GO

terms (Figure 3 and Table S2), we identified the underlying protein complexes, keeping only those identified as significantly enriched and belonging to the core complexes listed

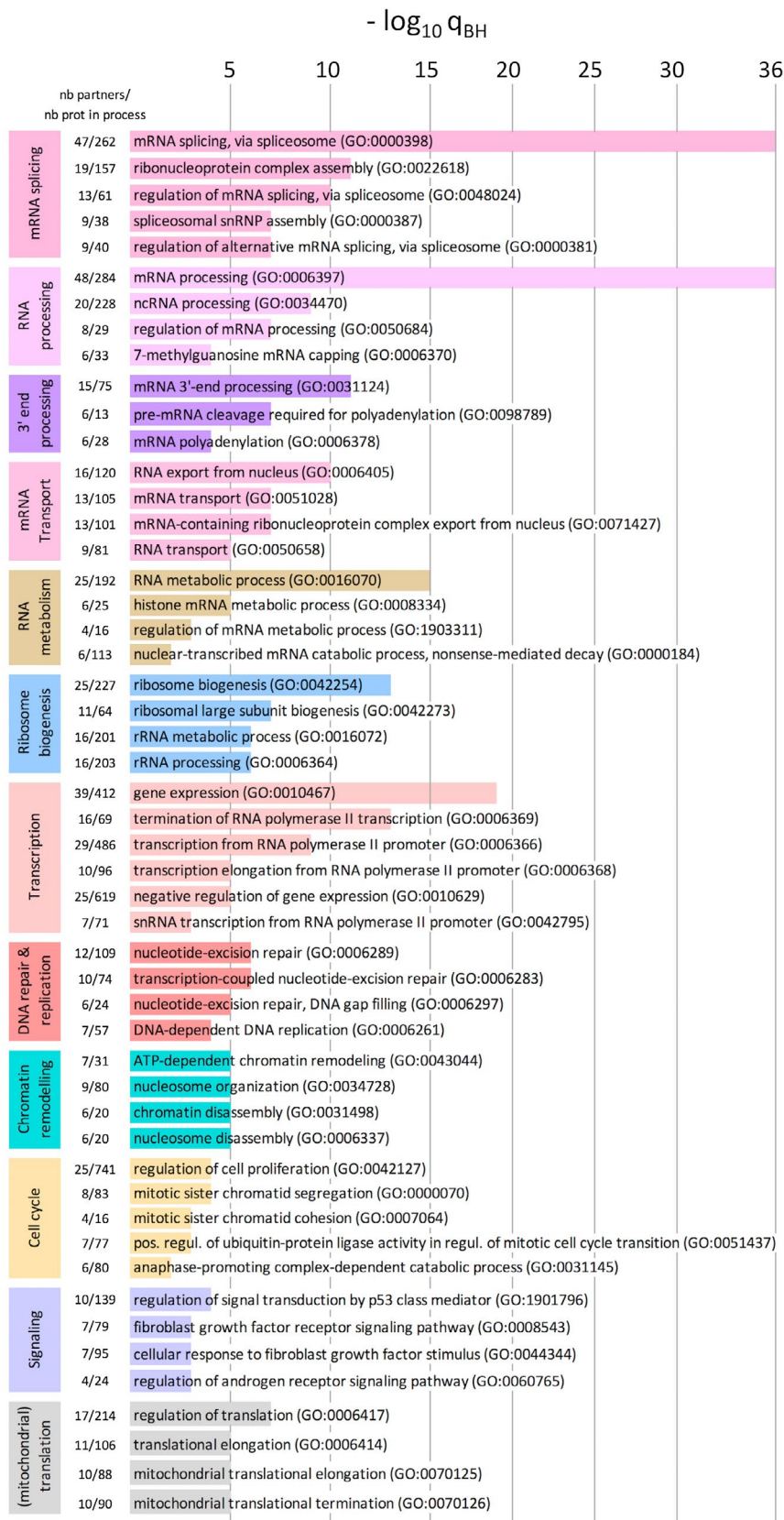


FIGURE 3 Biological pathways enrichment in the core set of 255 FOXL2 partners identified by MS. The Biological Pathway GO terms were retrieved with Enrichr using the list of 256 proteins (255 partners + FOXL2). The top non-redundant keywords are colored according to the over-represented pathways as in Figure 2, and are provided with the length of the bar representing their significance, as $-\log_{10}$ of the Benjamini-Hochberg corrected q-value (q_{BH})

in the CORUM database.^{37,38} The enriched complexes are highlighted in Figure 2 as clusters of highly interconnected proteins.

Interestingly and surprisingly, numerous co-IP partners suggest novel roles for FOXL2. For instance, 21 direct and indirect FOXL2 partners are implicated in DNA replication

and repair, including components of the Replication Factor C (RFC), the Fanconi Anemia (FA) complex and the KUNARG1 complex (Figures 2 and 3). Twenty co-IP proteins are implicated in chromatin remodeling, in particular components of diverse SWI-SNF remodeling complexes, pointing to a potential role of FOXL2 in chromatin-related processes beyond its mere activity as a TF. Although more expected for a TF than an involvement in DNA repair, such findings are novel. The fact that we identified several proteins belonging to the same complex increases the reliability of our results. For example, we found interactions with five out of nine subunits of the Anaphase-Promoting Complex (APC), and four out of the five subunits of RFC, clearly indicating a tight interaction of FOXL2 with the complex itself. Nevertheless, this does not imply that FOXL2 interacts directly with each of the subunits. This more likely points to a strong interaction between FOXL2 and only one or few subunits, that will mediate the precipitation of the whole complex.

The most striking result is the large number of partners that are known to be essential for the various stages of mRNA processing, namely splicing and alternative splicing, cleavage and polyadenylation, mRNA transport and regulation of stability and decay. Indeed, the most represented complex in our dataset is the spliceosome, with 30 proteins identified in the set of 255 interactors. Another group of 25 partners are related to ribosome biogenesis, and are notably known to play an important role in pre-rRNA processing and ribosomal subunits maturation, providing a further link to the regulation of cell cycle and proliferation. It is worth noting that 6 of the 7 interactors that we identify in both cell lines and that are confirmed by Li et al in their High-Confidence set (red-circled nodes in Figure 2) are included in these mRNA processing and ribosome biogenesis processes.

As described above, we performed the IP using three different anti-FOXL2 antibodies, directed against different parts of the protein. Interestingly, when we compared the abundances of all subunits in a given complex as retrieved with the three antibodies, we observed that some complexes appeared to have been precipitated only with one antibody, or with two of them but not the third one (Figure 4). This is particularly striking for the FA and APC complexes, for which the partners were exclusively or almost exclusively precipitated with the anti-Nter antibody; or the CPSF complex, with subunits almost only retrieved with the anti-Fkh antibody. This differential precipitation of a complex is most likely due to the steric availability of the targeted FOXL2 portion, and this points to diverse possibilities of FOXL2 to interact with a subunit, depending on the complex. On the other hand, an apparent lack of preferential co-IP by one antibody in our assay may suggest binding to multiple underlying complexes. This can be the case for the chromatin-remodeling complexes which comprise at least seven different SWI-SNF related

complexes, characterized by a different subset of subunits, around common subunits such as SMARCB1 and SMARC2.

These findings are reminiscent of what Li et al. observed for distinct chromatin-bound and soluble fractions for forkhead factors, that identified distinct complexes related to different biological processes. Indeed, amid the 52 proteins in common between our core data set and the partners identified by Li et al., the 10 proteins that were identified in their chromatin-bound fraction include only one partner that was preferentially retrieved by the anti-Fkh antibody in our assay (10%), whereas the 42 proteins present in their soluble fractions include 26 proteins preferentially retrieved with the anti-Fkh (62%). We obtain a similar difference if we consider our complete dataset of 863 proteins (19% and 63% respectively, Table S1), and this clearly points to the steric unavailability of the Fkh domain when FOXL2 is bound to DNA.

To confirm several of the direct and indirect partners, we performed independent co-IP experiments in endogenous conditions in both cell lines followed by Western blots (WB), using mostly the C-terminal anti-FoxL2 antibody (Cter) for availability reasons. In these experiments, we focused on several proteins belonging to complexes that play a role in chromatin remodeling, DNA replication and repair or mRNA processing and splicing. As shown in Figure 5, several proteins were specifically detected in co-IP/WBs using Alpha T3 cells. This was the case for the epigenetic factors and chromatin remodelers KDM1A (lysine-specific demethylase 1A), SUPT16H (or SPT16, a subunit of the FACT complex (*Facilitates Chromatin Transcription*)) and SMARCB1 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of Chromatin, Subfamily B, Member 1). Regarding DNA replication, we confirmed the interaction with RFC5, the smallest subunit of the RFC complex.³⁹ For RNA processing, we confirmed the interactions with HNRNPUL2 and SF3A2, also known as SAP62, one of the three subunits of the splicing factor SF3A.⁴⁰ Finally, we confirmed the interaction between FOXL2 and a complex containing CPSF4 (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 4), an essential component of the cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF).⁴¹ We obtained similar results in AT29C cells for SMARCB1, RFC5 or SF3A2 (Figure S2). However, the signals on the WB were weaker for almost all validated partners, probably because AT29C cells express FOXL2 less strongly than AlphaT3 cells.

To obtain an overview of the functional impact of the KD of *FOXL2* on pre-mRNA splicing in mouse primary granulosa cells, we performed RNA-seq coupled to differential splicing analysis. RT-qPCR confirmed a depletion of *FOXL2* mRNA greater than 90% for both 30 and 54 hours treatments (Figure 6A), which in our experience translates into >70% depletion at the protein level. As described above, differential

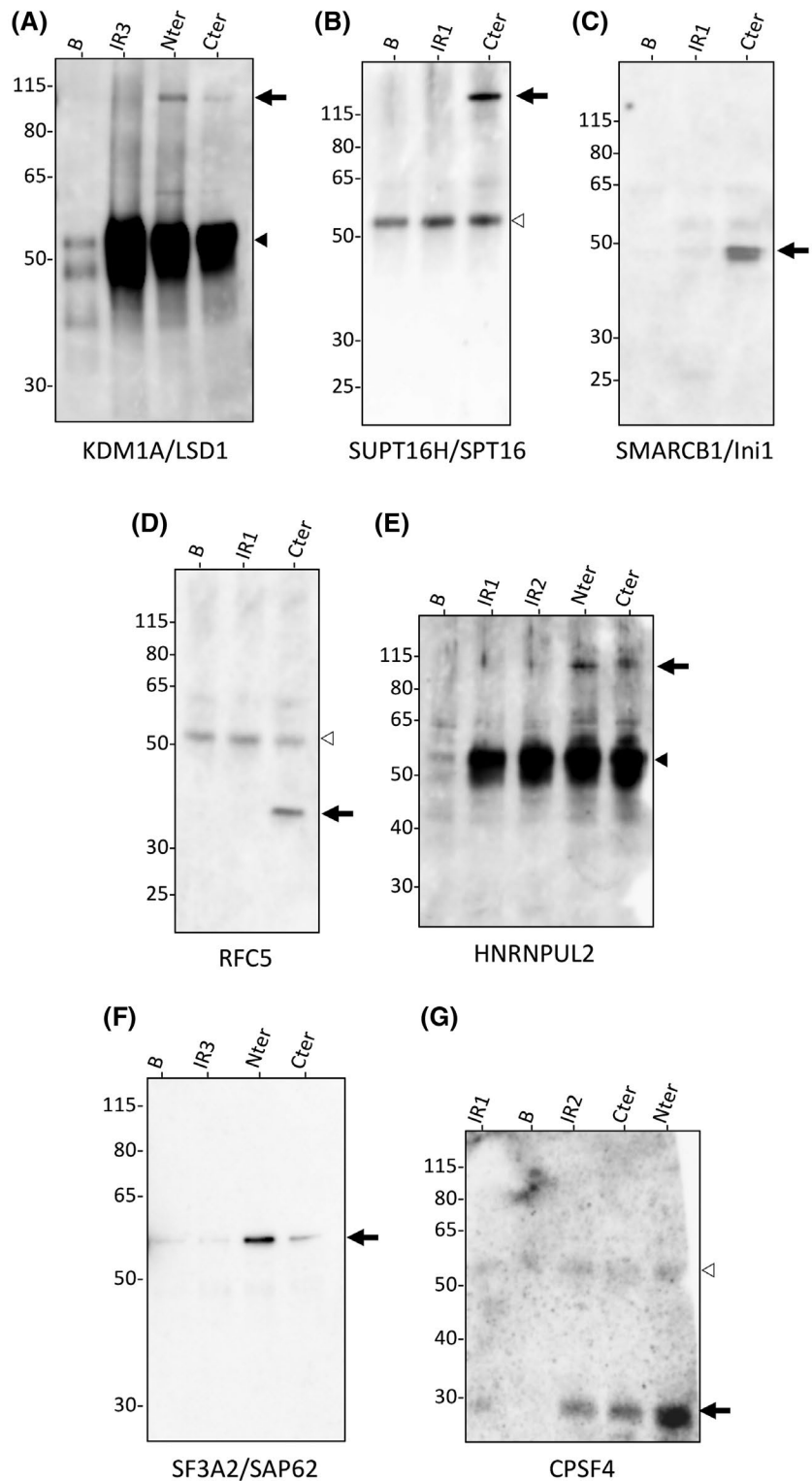
Process	Complex Name	Corum ID	Nbr proteins in MS data/ Nbr proteins in complex Associated p-value (set of 256 proteins)	Protein Name	Normalized relative abundances in MS		
					% Nter	% Fkh	% Cter
Cell Cycle	APC cpx	96	5/9 (5. 10-6)	ANAPC1	67	11	23
				ANAPC2	100	0	0
				ANAPC4	92	0	8
				ANAPC5	100	0	0
				CDC23	100	0	0
mRNA processing	NEXT cpx	7349	2/3 (2.10-4)	RBM7	85	15	0
				ZC3H18	86	0	14
	Spliceosome	351	27/142 (1. 10-14)	SRRT	97	2	0
				NCBP2	87	13	0
				ZCCHC8	81	11	9
				NCBP1	79	14	7
				SNRPA1	74	26	0
				CFAP20	71	29	0
				PRPF4B	55	41	4
				PIIH	12	35	52
				SNRPA	51	49	0
				RBM8A	39	50	11
				SF3A2	25	53	22
				RBMX	28	53	19
				CHERP	43	57	0
				XAB2	19	57	23
				SNU13	27	62	11
	CD2BP2	34	66	0			
	SF3A1	26	74	0			
	SNRPD2	14	86	0			
	SNRPE	10	90	0			
	VIRMA	7	91	3			
	WTAP	7	93	0			
	SMN cpx	1143	5/16 (1. 10-4)	GEMIN5	76	24	0
				DDX20	34	66	0
				SNRPD2	14	86	0
				SNRPE	10	90	0
				GEMIN6	4	96	0
CPSF cpx	1144	4/5 (5. 10-6)	CPSF4	17	81	2	
			CPSF3	2	89	9	
Polyadenylation cpx	1147	3/7 (5.10-4)	FIP1L1	6	92	2	
			CPSF1	5	95	0	
mRNA decay cpx	822	2/10 (0.02)	CSTF2	1	99	0	
			DCP2	34	66	0	
			EXOSC10	16	84	0	
Ribosome biogenesis	Parvulin-associated pre-rRNP cpx	3047	7/62 (0.04)	BOP1	8	80	11
				RRS1	20	75	5
				DDX24	9	70	21
				DDX56	5	66	29
				GTPBP4	2	62	36
				EBNA1BP2	11	60	29
				PES1	14	55	32
DNA replication and repair	FA cpx	2739	2/11 (0.02)	FANCG	100	0	0
				FANCL	100	0	0
	Ku antigen NARG1 cpx	95	2/3 (2.10-4)	XRCC6	46	1	53
				NAA15	4	54	42
	RFC cpx	1003	4/5 (5. 10-6)	RFC1	29	21	50
RFC2				14	44	42	
RFC4				17	66	17	
RFC5				21	40	40	
Chromatin remodelling	MLL1-WDR5 cpx	5386	3/27 (0.01)	MCRS1	27	58	15
				PRPF31	39	39	22
				SEN3	12	46	42
	SWI/SNF-related cpxs	1257 778 1230 149 189 714	ALL-1: 7/28 (3.10-6) LARC: 6/19 (4. 10-6) WINAC: 5/14 (1.10-5) PBAF: 4/12 (1.10-4) BAF: 4/13 (2.10-4) BRM-SIN3A: 6/15 (1.8 10-6)	GATAD2B	56	24	20
				SMARCB1	3	75	22
				SMARCE1	3	67	30
				SMARCD2	13	54	33
				BANF1	31	17	52
				RBBP7	31	8	61
				SMARCA2	7	21	72
Signaling	TNF- α /NF- κ B & WNT related cpxs	1255 5196 5233	2/4 (0.004) 2/12 (0.03) 2/25 (0.01)	CACYBP	15	9	76
				ANKRD28	10	39	51
				FBXW11	51	48	0

FIGURE 4 Differential retrieval of protein complexes for the IPs using the three anti-FOXL2 antibodies. The CORUM core complexes identified as enriched are provided with their identifier in the CORUM database, the number of subunits identified as FOXL2 partners in our set of 256 proteins over the known number of subunits, and the associated p-value for enrichment. The complexes are colored according to the over-represented pathways as in Figures 2 and 3. For each subunit, we calculated the relative contribution (in %) of the abundances measured for IPs with each antibody, normalized on the abundances for FOXL2. The subunits are shown if a relative contribution was above 50% (see complete results in Tables S1 and S3)

splicing analysis included EXON and PATTERN analyses, dedicated respectively to novel differentially regulated splicing events and to known splicing patterns (Figure 6B).

The comparison of the transcriptomes of cells treated with the siRNAs targeting FOXL2 (siFOXL2, 4 replicates) and those treated with the scramble siRNA (siSCR, 4 replicates)

FIGURE 5 Validation of specific interactions of FOXL2 with selected partners. Whole lysates of Alpha T3-1 cells were immunoprecipitated with Protein A-Dynabeads and polyclonal antibodies directed against FOXL2 (Nter and Cter) and with different amounts of an irrelevant polyclonal antibody (IR1: 1 μ g; IR2: 2 μ g; IR3: 2.5 μ g). IR1, IR2, IR3 and cell lysates incubated with Protein A-Dynabeads only (B) were used as controls. The IP and control samples were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis followed by immunoblotting with polyclonal antibodies against KDM1A (panel A) or HNRNPUL2 (panel E), or with monoclonal antibodies against SUPT16H/SPT16 (panel B); SMARCB1/Ini1 (panel C); RFC5 (panel D); SF3A2/SAP62 (panel F) or CPSF4 (panel G). Polypeptides at the expected molecular mass were specifically detected in Nter and Cter IP/WBs (arrows). Empty arrowheads: non-specific signals also observed in controls (in panels B, D, G). Black arrowheads: the strong signal around 50 kDa also observed in the control samples corresponds to IgG when using polyclonal antibodies (in panels A, E)



allowed us to detect 52 differentially spliced transcripts corresponding to 35 distinct genes (splicing index fold change > 2, splicing index p-value < 0.05) without dysregulation at the gene expression level (Table S4). About half of these alternative events were unknown (ie not described in databases) events, pointing to potential missplicing. Alternative terminal exons represented 11.5%, exon cassettes and intron retention 5% each, alternative acceptor and donor splice sites 2% each

(Figure 6C). The rest of the splicing events were mostly alternative first exons (23%), linked to the existence of alternative promoters, where we cannot rule out an effect of FOXL2 KD on promoter selection. Several examples are shown in Figure 6D-F. For Cd44 transcripts, splicing junction data show that exon 3 is less abundant in the siFOXL2 condition ($e2/e3$ and $e3/e4 \ll e2/e4$ events, Figure 6D). *Lims1* provides an example of the use of alternative first exons, with

four different start exons. Specifically, RNA-seq data show that, in the siFOXL2 condition, junction reads joining exon 3 and 5 are less abundant and junction reads between exons 4

and 5 are more abundant than in the control condition, showing a switch in first-exon usage (Figure 6E). Here, we cannot exclude a direct impact of FOXL2 depletion on promoter

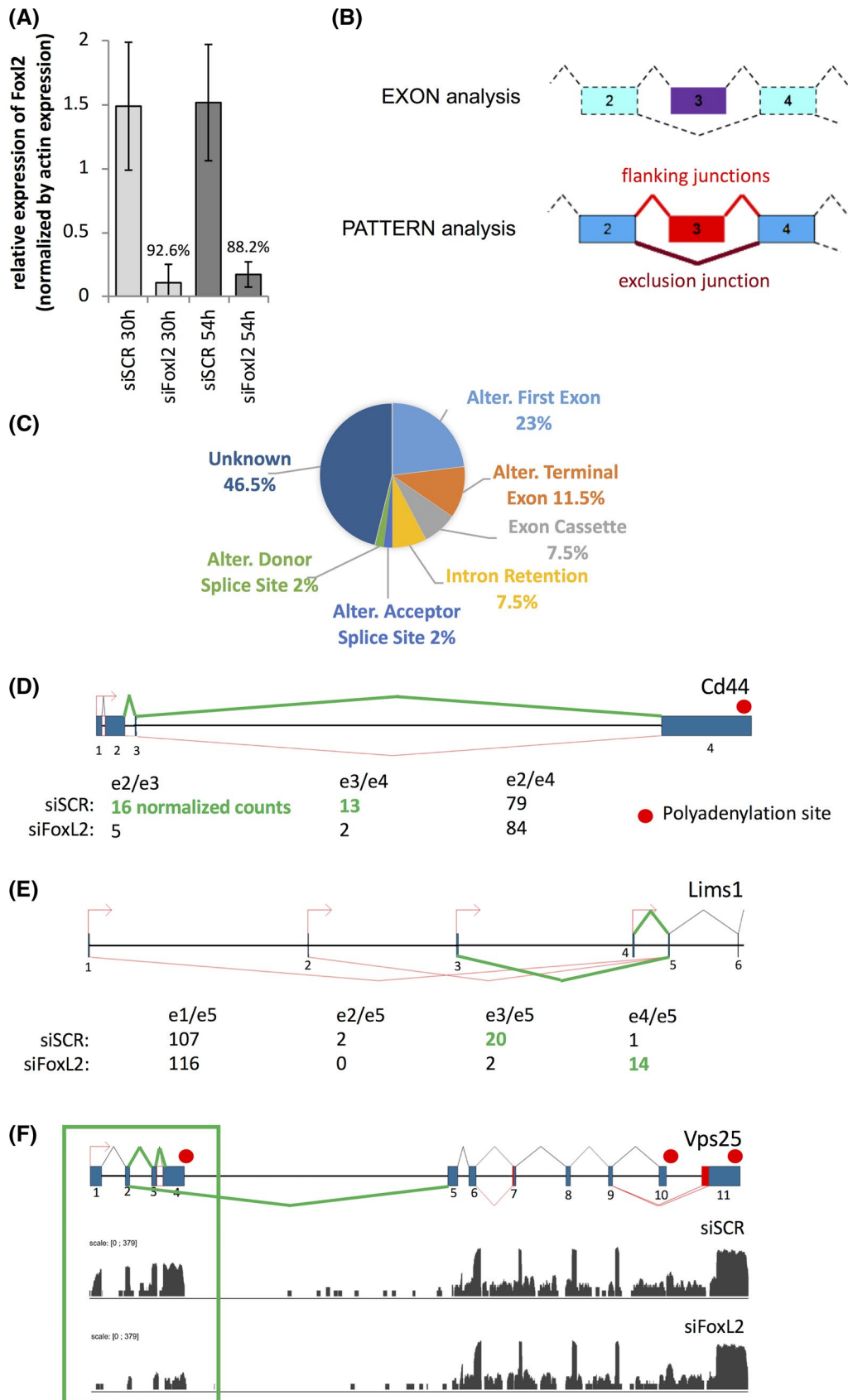


FIGURE 6 Analysis of alternative splicing events (ASEs) upon FOXL2 knockdown. A, Efficiency of FOXL2 depletion after 30 and 54 h of knockdown in the samples provided for RNA-sequencing. The mean knockdown efficiency in the RT-qPCR experiments ranged from 88% in the knockdown for 54 h to 93% in the knockdown for 30 h compared to the control condition (siSCR). B, Illustration of the EXON and PATTERN analyses based on an example of a gene with *n* exons and a known cassette exon (exons 3 represented in the middle). This example shows the regions selected for the analysis of exon 3 splicing regulation in both analyses. EXON analysis, focused on the exon 3 (purple), entails normalization with respect to the read count for the constitutive exons in light blue. PATTERN analysis, focused on exon 3 and flanking junctions (red) and exclusion junction (dark red), entails normalization with respect to the read count for exons flanking the alternative exon (blue). C, Pie chart showing the types of potential ASEs dependent on FOXL2. 52 differentially spliced transcripts appeared dysregulated by the knock down of FOXL2. D, Exon 3 of *Cd44* is a candidate alternative cassette exon. Flanking junctions involving exon 3 are less represented in the siFOXL2 condition than in the control siSCR, suggesting that exon 3 is skipped in FOXL2-depleted granulosa cells. E, *Lims1* presents four alternative first exons. According to RNA-seq, flanking junction data show a preferential usage of exon 4 in the siFOXL2 condition, instead of exon 3. F, Read counts of *VPS25* mRNA showing a decreased expression of exons 1 to 4 in the siFOXL2 condition, pointing to an event of alternative polyadenylation event (implying that the mRNA with exons 1-4 is less stable than the alternative transcripts)

selection. Figure 6F displays a potential case of alternative polyadenylation (which entails differential splicing) detected for *VPS25* during manual inspection of data. The decreased expression of the first four exons of *VPS25* in the siFOXL2 condition, while the rest of the mRNA was not affected, is compatible with an effect of Foxl2 on the processing of these mRNAs. Although these data are supportive of a function of FOXL2 in modulating splicing (and pre-mRNA processing in general) via protein-protein interactions, we cannot rule out an indirect role because our data also show that FOXL2 is able to modulate the expression of several splicing factors (Table S5).

A large number of proteins identified in our MS data are mitochondrial proteins, in particular subunits of the mitochondrial ribosome (16 mitochondrial proteins in the set of 255 with 10 mitoribosome subunits). This was consistent with the results of Li et al who identified 48 mitoribosome subunits, including in their High-Confidence dataset.²⁵ However, we failed to detect FOXL2 in WB with protein extract from purified mitochondria from both cell lines (Figure S3). This indicates that either these interactions are artifactual or that they take place in the cytoplasm before the mitochondrial proteins are imported into the mitochondria.⁴² Because we could not further validate these interactions by co-IP+WB, we did not take them into consideration beyond the enrichment analysis displayed in Figure 3.

4 | DISCUSSION

As mentioned above, FOXL2 dysfunction leads to premature ovarian insufficiency and ovarian granulosa cell tumors. Thus, learning more about its partners may help us better understand how its mutations or dysregulation lead to pathological conditions.

One outstanding feature of our proteomic study is that the list of candidate partners includes several members of the same complexes. This does not imply that FOXL2 interacts

with all of them but with one or a few subunits that are able to drag the whole stable complex during the co-IP process. The upside of this is that the redundant information in the identification of the complexes lends credence to the interaction between FOXL2 and such complexes.

We identified partners that point to roles of FOXL2 both in chromatin-related and unrelated processes. Regulation of transcription is the main role of a TF, so it comes with no surprise that we identified a set of TFs as potential partners. Among these, the identification of previously known co-factors, such as SMAD3 and NR5A1, validates our data.

Our results also suggest that FOXL2 may play novel roles related to DNA replication and repair or chromatin remodeling. With regard to DNA replication and repair, we confirmed the interaction with a complex containing RFC5 that has a major role in DNA replication and DNA polymerase switching, DNA repair and cell cycle checkpoint control.^{39,43} A role for FOXL2 in these crucial processes is supported by its interaction with HNRNPUL2 (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein U-like Protein 2), which promotes DNA double strand break signaling and repair⁴⁴ and with the helicase XRCC6 (KU70) involved in double strand DNA repair^{45,46} and probably in telomeric stability.⁴⁷ Interestingly, XRCC6 also interacts with other FOXL2 partners such as ESR1⁴⁸ and SMAD3,⁴⁹ pointing to the existence of alternative complexes and/or higher order complexes. We have previously shown that the interaction of XRCC6 with FOXL2 leads to an inhibition of the transactivation ability of the latter on several reporter promoters and its apoptosis-inducing capacity, suggesting a potential implication in granulosa cell tumorigenesis.²¹

The activation of estrogen-responsive genes by ESR1 has been shown to require scheduled TOP2B-induced double strand breaks repaired by classical repair factors,⁴⁸ in order to release promoter-paused RNA polymerases II, a process common to signal-dependent genes activated by many other nuclear hormone receptors.⁵⁰⁻⁵² ESR1 is a known FOXL2 co-factor,²⁰ and our MS data identify other major actors of this process: TOP2B, XRCC6, RNA Pol II (eight subunits of the RNA polymerase II holoenzyme complex),

KDM1A/LSD1 and PARP2, suggesting that FOXL2 acts in this specific transcriptional regulation mechanism.

This DNA cleavage-dependent transcriptional regulation process also involves chromatin remodeling, and indeed, we identify several partners implicated in chromatin remodeling, epigenetic regulation and genome spatial organization. We were able to confirm the interaction between FOXL2 and epigenetic factors and chromatin remodelers such as KDM1A, SUPT16H and SMARCB1. KDM1A is an important epigenetic modifier that demethylates lysine 4 or lysine 9 of histone 3 (H3K4me1/2 and H3K9me1/2) thus modulating transcription, including that of estrogen- and Myc-regulated genes.⁵³⁻⁵⁵ SUPT16H is a subunit of the FACT complex, which interacts with H2A/H2B histones affecting nucleosome disassembly and transcription elongation.⁵⁶ Finally, SMARCB1 is a core subunit of the BAF (SWI/SNF) chromatin remodeling complex that relieves repressive chromatin structures, allowing the transcriptional machinery to access its targets more effectively.^{57,58} Depending on the exact subunits associated with SMARCB1, up to seven different chromatin remodeling and nuclear organization complexes could be formed with FOXL2 partners identified in our study. Those include a direct FOXL2 partner that we had previously identified, BANF1, a nuclear factor involved in nuclear and chromatin assembly and cell cycle progression through S phase in mammalian cells.^{21,59} BANF1 interacts with other TFs, such as LEDGF, NonO, p15/SUB1/PC4 and Requiem, but the regulatory result of such interactions is not known.⁶⁰ We have previously shown that the interaction of FOXL2 with BANF1 leads to a mild inhibition of its transactivation ability on a series of reporter promoters, suggesting that it modulates the activity of FOXL2. Consistently, we found that BANF1 abolishes the FOXL2 pro-apoptotic capacity. On the basis of the implication of BANF1 in Emerin-related complexes bound to lamins (of which we find 12 subunits in our MS data, including Lamin A and Emerin), one can postulate that this repressive regulation could act through relocation of genes to the nuclear periphery.^{61,62}

A chromatin-independent link with cell cycle regulation is provided by the identification of the Anaphase-Promoting Complex as a partner complex. APC, an evolutionarily conserved ubiquitin ligase, controls cell cycle progression by regulating the proteasome-dependent degradation of Securin and mitotic cyclins, therefore triggering chromatid separation and mitotic exit at the end of M phase. APC is kept inactive by the spindle activation checkpoint (SAC) that monitors correctly attached and aligned kinetochores.⁶³ Thus, finding 5 of the APC subunits and 2 of the SAC proteins among FOXL2 partners suggests that a part of the cell cycle regulation and tumor suppressing activity of FOXL2 could be mediated by these interactions.

Other potential chromatin-independent novel roles of FOXL2 are suggested by the numerous partners uncovered

in our MS data that are implicated in various stages of RNA processing, splicing and maturation. Indeed, the most prominent GO terms for our core dataset are *mRNA splicing* and *RNA processing* and, logically, the most represented complex is the spliceosome. Although most of these interactions are indirect, we could still confirm the interaction of FOXL2 with SF3A2/SAP62, one of the three subunits of SF3A,⁴⁰ a factor required for spliceosomal complex E assembly.⁶⁴ The potential impact of FOXL2 on pre-mRNA processing is epitomized by the evidence supporting differential splicing and missplicing in a series of genes, as detected by RNA-seq. This is reminiscent of the action of the transcription factor SOX9 in the Sertoli cells of the male gonad (functional equivalent of granulosa cells in the ovary). Indeed, beyond modulating transcription, SOX9 also directly or indirectly regulates differential splicing of its targets by binding to genomic regions bearing conserved sequence motifs.⁶⁵ The involvement in pre-mRNA splicing has also been reported for other TFs.⁶⁶ As noted above, we cannot rule out an indirect role of FOXL2 on splicing because our data show that it is also able to modulate the expression of several splicing factors. Further studies are required to disentangle the direct (through protein-protein interactions) and indirect impact of FOXL2 on splicing.

Other numerous partners point to the interaction with complexes involved in mRNA 5'-end processing (such as the nuclear cap binding factors NCBP1 and NCBP2), mRNA transport (such as RAN and RANBP2), and mRNA 3'-end cleavage and polyadenylation. Indeed, we confirmed FOXL2 interaction with a complex containing CPSF4 (Cleavage and polyadenylation specificity factor 4), an RNA-binding subunit of the cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) complex that plays the major role in pre-mRNA 3'-end formation.⁶⁷ We also retrieved DDX20, a DEAD-box RNA helicase that is implicated in nuclear and mitochondrial splicing, and ribosome and spliceosome assembly, already identified as a direct FOXL2 partner.¹⁹ DDX20 is a core member of the essential survival motor neuron (SMN) complex, that is required for the assembly and nuclear import of small nuclear ribonucleoproteins, in particular those composing the spliceosome.^{68,69} This SMN complex is statistically over-represented in our core dataset, further linking FOXL2 to splicing regulation. All these steps in the maturation of mRNAs are tightly regulated at higher complex levels involving supraspliceosomes that enable the coordination of several splicing events on single transcripts.⁷⁰

Another large set of partners identified in our MS data is implicated in rRNA processing and ribosome biogenesis, or are even part of the ribosome itself. This is for example the case of several DEAD-box RNA helicases, such as DDX52 also identified by Li et al. in their High-confidence set, or DDX20 mentioned above. A statistically enriched complex is

the parvulin-associated pre-rRNP complex, required for the processing of 18 and 28 S rRNAs and normal cell growth.⁷¹ We also identified 18 proteins from both ribosomal subunits, 14 of which were also retrieved by Li et al. This indicates that FOXL2 could play a role during ribosomal biogenesis in the nucleus, and/or could retain an interaction with the ribosome in the cytoplasm. In their systematic study, Li et al. found that most TFs (including FOXL2) form distinct protein complexes in soluble fraction or associated with chromatin. We obtain a significant overlap between our datasets and theirs, therefore the two approaches are validating each other. Furthermore, the fact that Li et al. identified different complexes in the soluble and chromatin-associated fractions supports our differential identification of complexes according to the antibodies used for IP. In this context, it is striking that for the two complexes with the best overlap between the two studies, the Parvulin-associated pre-rRNP complex and the ribosome, all the proteins in common were identified only in the Soluble fraction by Li et al (7/14 for the former, 14/18 for the latter, Table S1), and the subunits we identified were retrieved preferentially with the anti-Fkh antibody. This suggests that the forkhead domain was sterically available (ie not bound to DNA), and that those two complexes are indeed in the soluble fraction and not associated with chromatin.

Although we failed to confirm the location of FOXL2 in the mitochondria suggested by the numerous interactions with mitochondrial proteins, other forkhead TFs have been implicated in mitochondrial maintenance, in particular during stress response.⁷² Specifically, FOXO1 and FOXO3a have been shown to localize to mitochondria under specific conditions, in particular nutrient stress, and to bind to mitochondrial DNA to regulate mitochondrial transcription.⁷³⁻⁷⁵ The relevance, if any, of the interactions between FOXL2 and mitochondrial proteins found by Li et al and ourselves remain to be explored.

Our core set of partners include many factors known to play a role in regulating transcription, alternative splicing, alternative polyadenylation, mRNA modification and processing, in particular within nuclear speckles, a statistically enriched nuclear domain.⁷⁶ These results point to an involvement of FOXL2 not only in transcription but also in the regulation of splicing, alternative splicing and alternative polyadenylation. Patterns of mRNA alternative splicing and maturation are often altered in cancer, and alternative splicing deregulations can be considered as oncogenic, in a similar manner as driver mutations in oncogenes or tumor suppressors.^{77,78} Given the interaction between FOXL2 and the mRNA processing machinery, in particular the spliceosome, we hypothesize that the implication of mutated FOXL2 in tumorigenesis is not only due to transcription dysregulation but also to altered mRNA processing.

Finally, it is worth mentioning that in this analysis of our MS data, we focused on common partners between the two cell lines, as an additional element of reliability. Nevertheless, the

two cell types have specific regulations. We have provided the complete dataset for further analyses of specific partners and complexes in one or the other cell line. Overall, this comprehensive analysis of endogenous FOXL2 interactome highlights many novel partners that suggest very interesting roles for this factor, and provide a basis for further functional investigations.

ACKNOWLEDGMENTS

We warmly thank Camille Garcia from the Institut Jacques Monod Proteomics platform for excellent technical assistance. This study was supported by Université Paris Diderot (ALT, SC, RAV), and the Fondation pour la Recherche Médicale (Labelisation Equipes DEQ20150331757, MPM, CP, LH, ALT, SC, RAV). We thank Vanessa Ribes for helpful comments on the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.A. Veitia conceived and led the project. M. Penrad-Mobayed, C. Perrin, and A.-L. Todeschini performed the IP and WB experiments; F. Nigon and B. Cosson contributed the mitochondrial fractionation analysis; S. Caburet performed the bioinformatic analysis; S. Caburet and R.A. Veitia performed the data mining; S. Caburet, M. Penrad-Mobayed, and R.A. Veitia wrote the manuscript; with input from all authors.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Benayoun BA, Caburet S, Veitia RA. Forkhead transcription factors: key players in health and disease. *Trends Genet.* 2011;27:224-232.
2. Crisponi L, Deiana M, Loi A, et al. The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet.* 2001;27:159-166.
3. Shah SP, Köbel M, Senz J, et al. Mutation of FOXL2 in granulosa-cell tumors of the ovary. *N Engl J Med.* 2009;360:2719-2729.
4. Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, et al. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development.* 2004;131:933-942.
5. Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, et al. Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet.* 2004;13:1171-1181.
6. Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, et al. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell.* 2009;139:1130-1142.
7. Boulanger L, Pannetier M, Gall L, et al. FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat. *Curr Biol.* 2014;24:404-408.
8. Batista F, Vaiman D, Dausset J, Fellous M, Veitia RA. Potential targets of FOXL2, a transcription factor involved in craniofacial and follicular development, identified by transcriptomics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:3330-3335.

9. Pisarska MD, Bae J, Klein C, Hsueh AJW. Forkhead l2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. *Endocrinology*. 2004;145:3424-3433.
10. Pannetier M, Fabre S, Batista F, et al. FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *J Mol Endocrinol*. 2006;36:399-413.
11. Georges AB, Benayoun BA, Caburet S, Veitia RA. Generic binding sites, generic DNA-binding domains: where does specific promoter recognition come from? *FASEB J*. 2010;24:346-356.
12. Kuo F-T, Bentsi-Barnes IK, Barlow GM, Bae J, Pisarska MD. Sumoylation of forkhead L2 by Ubc9 is required for its activity as a transcriptional repressor of the Steroidogenic Acute Regulatory gene. *Cell Signal*. 2009;21:1935-1944.
13. Pisarska MD, Kuo F-T, Bentsi-Barnes IK, Khan S, Barlow GM. LATS1 phosphorylates forkhead L2 and regulates its transcriptional activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299:E101-E109.
14. Ellsworth BS, Burns AT, Escudero KW, Duval DL, Nelson SE, Clay CM. The gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor activating sequence (GRAS) is a composite regulatory element that interacts with multiple classes of transcription factors including Smads, AP-1 and a forkhead DNA binding protein. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;206:93-111.
15. Justice NJ, Blount AL, Pelosi E, Schlessinger D, Vale W, Bilezikjian LM. Impaired FSHbeta expression in the pituitaries of Foxl2 mutant animals. *Mol Endocrinol*. 2011;25:1404-1415.
16. Lamba P, Fortin J, Tran S, Wang Y, Bernard DJ. A novel role for the forkhead transcription factor FOXL2 in activin A-regulated follicle-stimulating hormone beta subunit transcription. *Mol Endocrinol*. 2009;23:1001-1013.
17. Blount AL, Schmidt K, Justice NJ, Vale WW, Fischer WH, Bilezikjian LM. FoxL2 and Smad3 coordinately regulate follistatin gene transcription. *J Biol Chem*. 2009;284:7631-7645.
18. Park M, Shin E, Won M, et al. FOXL2 interacts with steroidogenic factor-1 (SF-1) and represses SF-1-induced CYP17 transcription in granulosa cells. *Mol Endocrinol*. 2010;24:1024-1036.
19. Lee K, Pisarska MD, Ko J-J, et al. Transcriptional factor FOXL2 interacts with DP103 and induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;336:876-881.
20. Kim S-Y, Weiss J, Tong M, Laronda MM, Lee E-J, Jameson JL. Foxl2, a forkhead transcription factor, modulates nonclassical activity of the estrogen receptor-alpha. *Endocrinology*. 2009;150:5085-5093.
21. L'Hôte D, Georges A, Todeschini AL, et al. Discovery of novel protein partners of the transcription factor FOXL2 provides insights into its physiopathological roles. *Hum Mol Genet*. 2012;21:3264-3274.
22. Benayoun BA, Batista F, Auer J, et al. Positive and negative feedback regulates the transcription factor FOXL2 in response to cell stress: evidence for a regulatory imbalance induced by disease-causing mutations. *Hum Mol Genet*. 2009;18:632-644.
23. Benayoun BA, Georges AB, L'Hôte D, et al. Transcription factor FOXL2 protects granulosa cells from stress and delays cell cycle: role of its regulation by the SIRT1 deacetylase. *Hum Mol Genet*. 2011;20:1673-1686.
24. Alves-Fernandes DK, Jasiulionis MG. The role of SIRT1 on DNA damage response and epigenetic alterations in cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20:3153.
25. Li X, Wang W, Wang J, et al. Proteomic analyses reveal distinct chromatin-associated and soluble transcription factor complexes. *Mol Syst Biol*. 2015;11:775.
26. Horn F, Bilezikjian LM, Perrin MH, et al. Intracellular responses to gonadotropin-releasing hormone in a clonal cell line of the gonadotrope lineage. *Mol Endocrinol*. 1991;5:347-355.
27. Ellsworth BS, Egashira N, Haller JL, et al. FOXL2 in the pituitary: molecular, genetic, and developmental analysis. *Mol Endocrinol*. 2006;20:2796-2805.
28. Dutertre M, Gouédard L, Xavier F, et al. Ovarian granulosa cell tumors express a functional membrane receptor for anti-Müllerian hormone in transgenic mice. *Endocrinology*. 2001;142:4040-4046.
29. Cocquet J, Pailhoux E, Jaubert F, et al. Evolution and expression of FOXL2. *J Med Genet*. 2002;39:916-921.
30. Marongiu M, Marcia L, Pelosi E, et al. FOXL2 modulates cartilage, skeletal development and IGF1-dependent growth in mice. *BMC Dev Biol*. 2015;15:27.
31. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:W90-W97.
32. Elzaïat M, Herman L, Legois B, Léger T, Todeschini A-L, Veitia RA. High-throughput exploration of the network dependent on AKT1 in mouse ovarian granulosa cells. *Mol Cell Proteomics*. 2019;18:1307-1319.
33. Noli L, Capalbo A, Ogilvie C, Khalaf Y, Ilic D. Discordant growth of monozygotic twins starts at the blastocyst stage: a case study. *Stem Cell Reports*. 2015;5:946-953.
34. Gandoura S, Weiss E, Rautou P-E, et al. Gene- and exon-expression profiling reveals an extensive LPS-induced response in immune cells in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 2013;58:936-948.
35. Wang E, Aslanzadeh V, Papa F, Zhu H, de la Grange P, Cambi F. Global profiling of alternative splicing events and gene expression regulated by hnRNPH/F. *PLoS ONE*. 2012;7:e51266.
36. Mellacheruvu D, Wright Z, Couzens AL, et al. The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nat Methods*. 2013;10:730-736.
37. Ruepp A, Waegele B, Lechner M, et al. CORUM: the comprehensive resource of mammalian protein complexes—2009. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:D497-D501.
38. Giurgiu M, Reinhard J, Brauner B, et al. CORUM: the comprehensive resource of mammalian protein complexes-2019. *Nucleic Acids Res*. 2019;47:D559-D563.
39. Li Y, Gan S, Ren L, et al. Multifaceted regulation and functions of replication factor C family in human cancers. *Am J Cancer Res*. 2018;8:1343-1355.
40. Brosi R, Gröning K, Behrens SE, Lührmann R, Krämer A. Interaction of mammalian splicing factor SF3a with U2 snRNP and relation of its 60-kD subunit to yeast PRP9. *Science*. 1993;262:102-105.
41. Thore S, Fribourg S. Structural insights into the 3'-end mRNA maturation machinery: snapshot on polyadenylation signal recognition. *Biochimie*. 2019;164:105-110.
42. Lesnik C, Golani-Armon A, Arava Y. Localized translation near the mitochondrial outer membrane: an update. *RNA Biol*. 2015;12:801-809.
43. Shiomi Y, Nishitani H. Control of genome integrity by RFC complexes; conductors of PCNA loading onto and unloading from chromatin during DNA replication. *Genes (Basel)*. 2017;8:52.
44. Polo SE, Blackford AN, Chapman JR, et al. Regulation of DNA-end resection by hnRNPU-like proteins promotes DNA double-strand break signaling and repair. *Mol Cell*. 2012;45:505-516.

45. Tuteja N, Tuteja R, Ochem A, et al. Human DNA helicase II: a novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen. *EMBO J*. 1994;13:4991-5001.
46. Baumann P, West SC. DNA end-joining catalyzed by human cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:14066-14070.
47. Ting NSY, Yu Y, Pohorelic B, Lees-Miller SP, Beattie TL. Human Ku70/80 interacts directly with hTR, the RNA component of human telomerase. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:2090-2098.
48. Ju B-G, Lunyak VV, Perissi V, et al. A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science*. 2006;312:1798-1802.
49. Colland F, Jacq X, Trouplin V, et al. Functional proteomics mapping of a human signaling pathway. *Genome Res*. 2004;14:1324-1332.
50. Fong YW, Cattoglio C, Tjian R. The intertwined roles of transcription and repair proteins. *Mol Cell*. 2013;52:291-302.
51. Alemasova EE, Lavrik OI. At the interface of three nucleic acids: the role of RNA-binding proteins and poly(ADP-ribose) in DNA repair. *Acta Naturae*. 2017;9:4-16.
52. Madabhushi R. The Roles of DNA topoisomerase IIβ in transcription. *Int J Mol Sci*. 2018;19:1917.
53. Burg JM, Gonzalez JJ, Maksimchuk KR, McCafferty DG. Lysine-specific demethylase 1A (KDM1A/LSD1): product recognition and kinetic analysis of full-length histones. *Biochemistry*. 2016;55:1652-1662.
54. Perillo B, Ombra MN, Bertoni A, et al. DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression. *Science*. 2008;319:202-206.
55. Amente S, Bertoni A, Morano A, Lania L, Avvedimento EV, Majello B. LSD1-mediated demethylation of histone H3 lysine 4 triggers Myc-induced transcription. *Oncogene*. 2010;29:3691-3702.
56. Orphanides G, LeRoy G, Chang CH, Luse DS, Reinberg D. FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell*. 1998;92:105-116.
57. Euskirchen G, Auerbach RK, Snyder M. SWI/SNF chromatin-remodeling factors: multiscale analyses and diverse functions. *J Biol Chem*. 2012;287:30897-30905.
58. Kim KH, Roberts CWM. Mechanisms by which SMARCB1 loss drives rhabdoid tumor growth. *Cancer Genet*. 2014;207:365-372.
59. Cox JL, Mallanna SK, Ormsbee BD, Desler M, Wiebe MS, Rizzino A. Banf1 is required to maintain the self-renewal of both mouse and human embryonic stem cells. *J Cell Sci*. 2011;124:2654-2665.
60. Montes de Oca R, Shoemaker CJ, Gucek M, Cole RN, Wilson KL. Barrier-to-autointegration factor proteome reveals chromatin-regulatory partners. *PLoS ONE*. 2009;4:e7050.
61. Margalit A, Brachner A, Gotzmann J, Foisner R, Gruenbaum Y. Barrier-to-autointegration factor—a BAFfling little protein. *Trends Cell Biol*. 2007;17:202-208.
62. van Steensel B, Belmont AS. Lamina-associated domains: links with chromosome architecture, heterochromatin, and gene repression. *Cell*. 2017;169:780-791.
63. Liu X, Chen Y, Li Y, Petersen RB, Huang K. Targeting mitosis exit: a brake for cancer cell proliferation. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019;1871:179-191.
64. Das R, Zhou Z, Reed R. Functional association of U2 snRNP with the ATP-independent spliceosomal complex E. *Mol Cell*. 2000;5:779-787.
65. Rahmoun M, Lavery R, Laurent-Chaballier S, et al. In mammalian foetal testes, SOX9 regulates expression of its target genes by binding to genomic regions with conserved signatures. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:7191-7211.
66. Rambout X, Dequiedt F, Maquat LE. beyond transcription: roles of transcription factors in pre-mRNA splicing. *Chem Rev*. 2018;118:4339-4364.
67. MacDonald CC. Tissue-specific mechanisms of alternative polyadenylation: testis, brain, and beyond (2018 update). *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2019;10:e1526.
68. Curmi F, Cauchi RJ. The multiple lives of DEAD-box RNA helicase DP103/DDX20/Gemin3. *Biochem Soc Trans*. 2018;46:329-341.
69. Burghes AHM, Beattie CE. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat Rev Neurosci*. 2009;10:597-609.
70. Sperling J, Sperling R. Structural studies of the endogenous spliceosome—the supraspliceosome. *Methods*. 2017;125:70-83.
71. Fujiyama-Nakamura S, Yoshikawa H, Homma K, et al. Parvulin (Par14), a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, is a novel rRNA processing factor that evolved in the metazoan lineage. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8:1552-1565.
72. Kim S, Koh H. Role of FOXO transcription factors in crosstalk between mitochondria and the nucleus. *J Bioenerg Biomembr*. 2017;49:335-341.
73. Jacobs KM, Pennington JD, Bisht KS, et al. SIRT3 interacts with the daf-16 homolog FOXO3a in the mitochondria, as well as increases FOXO3a dependent gene expression. *Int J Biol Sci*. 2008;4:291-299.
74. Peserico A, Chiacchiera F, Grossi V, et al. A novel AMPK-dependent FoxO3A-SIRT3 intramitochondrial complex sensing glucose levels. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70:2015-2029.
75. Lettieri-Barbato D, Ioannilli L, Aquilano K, Ciccarone F, Rosina M, Ciriolo MR. FoxO1 localizes to mitochondria of adipose tissue and is affected by nutrient stress. *Metab Clin Exp*. 2019;95:84-92.
76. Galganski L, Urbanek MO, Krzyzosiak WJ. Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:10350-10368.
77. Oltean S, Bates DO. Hallmarks of alternative splicing in cancer. *Oncogene*. 2014;33:5311-5318.
78. El Marabti E, Younis I. The cancer spliceome: reprogramming of alternative splicing in cancer. *Front Mol Biosci*. 2018;5:8-10.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Penrad-Mobayed M, Perrin C, Herman L, et al. Conventional and unconventional interactions of the transcription factor FOXL2 uncovered by a proteome-wide analysis. *The FASEB Journal*. 2020;34:571-587. <https://doi.org/10.1096/fj.201901573R>

3) Discussion de l'article 2

L'identification de nouveaux partenaires de FOXL2 suggère l'existence de nouvelles fonctions variées et complexes pour FOXL2. De façon assez attendu parmi tous ces partenaires, un grand set de FT a été identifié dont SMAD3 et NR5A1, déjà connus pour interagir avec FOXL2, soulignant l'importance des interactions protéines-protéines dans la reconnaissance et la régulation de l'expression des gènes cibles. Les nouveaux partenaires potentiels identifiés comprennent de nombreux facteurs connus pour jouer un rôle dans la régulation de la transcription, de l'épissage alternatif, de la polyadénylation alternative, de la modification et du traitement de l'ARNm, en particulier au sein des speckles nucléaires, un domaine nucléaire.

Les FT ont déjà été décrits comme pouvant jouer un rôle dans l'épissage (301) selon plusieurs mécanismes (302) brièvement présentés ci-dessous. Leurs actions peuvent avoir lieu :

- *via* la fixation aux promoteurs : cette hypothèse vient d'expériences de remplacement de promoteurs de gènes normalement transcrits par la RNAPII par des promoteurs reconnus par la RNAPI. Ces échanges provoquent une chute de la polyadénylation et de l'épissage du pré-ARNm suggérant qu'il existe dans les promoteurs des séquences nécessaires au bon déroulement de l'épissage.
- *via* un contrôle de l'élongation : passant par le recrutement et la stabilisation de la polymérase.
- *via* le recrutement de facteurs du spliceosome (exemple des récepteurs nucléaires ou de Mei4 ou fkd2 dans la levure).
- *via* une fixation du FT sur la séquence du gène : stabilisation de la structure, modification de la méthylation,
- *via* une action indépendante de la fixation à l'ADN : inhibition des facteurs de l'épissage par interaction avec le FT, implication dans la formation du spliceosome,...

Pour FOXL2, si l'effet sur l'épissage a été démontré par l'analyse de l'épissage en condition KD de *Foxl2*, le rôle de la fixation de FOXL2 lui-même à proximité de certain site n'a pas pu être montré. La CHIP-seq de FOXL2 réalisée en cellules murines primaires de la granulosa a montré 2 475 pics de FOXL2 ([article 1](#)) mais après alignement de ces pics sur le génome, il s'avère qu'aucun ne se trouve au niveau d'un site d'épissage identifié. Le rôle de FOXL2 dans le splicing ne passe donc probablement pas par la fixation du FT au niveau du site de splicing mais peut-être par des interactions protéines-protéines qu'ils restent à définir plus précisément.

Les schémas d'épissage alternatif et de maturation de l'ARNm sont souvent modifiés dans le cancer, et les dérégulations de l'épissage alternatif peuvent être considérées comme oncogènes, de la même manière que les mutations dans les oncogènes ou les suppresseurs de tumeurs (303). Étant donné l'interaction entre FOXL2 et les machines de traitement de l'ARNm, en particulier l'épissage, nous émettons l'hypothèse que l'implication dans la tumorigenèse de la mutation oncogénique FOXL2 p.C134W (retrouvée dans 95% des AGCTs) (283) n'est peut être pas seulement due à une dérégulation de la transcription mais aussi à un traitement altéré de l'ARNm. Des études d'épissage similaires à celle réalisée dans cet article sur des tumeurs de patients couplées à l'analyse des transcrits pourraient fournir de nouvelles informations intéressantes sur le processus associé à la formation des AGCT et aux mécanismes moléculaires mis en jeu.

2. FOXL2 et le cancer des cellules de la granulosa

A. Introduction

En 2009, Shah *et al.* (283) ont effectué une étude de transcriptome entier sur 4 AGCTs. Ils ont alors identifié une mutation somatique récurrente faux-sens (402C→G) dans la séquence de *FOXL2* menant à la substitution protéique p.C134W, localisée dans le domaine *FKH*. La mutation a ensuite été retrouvée dans 86 des 89 AGCTs étudiées afin de confirmer cette découverte, soit dans plus de 97% des cas. Comme présenté dans l'introduction, d'autres tumeurs ont été séquencées depuis et cette mutation est retrouvée à l'état hétérozygote dans l'immense majorité des cas avec même une identification de deux patientes présentant l'allèle muté à l'état homozygote. Il apparaît donc essentiel de déterminer les mécanismes d'action de *FOXL2*, ainsi que les voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse, afin de pouvoir prévenir l'apparition des AGCTs et d'éviter leur récurrence. En effet, les AGCTs sont cliniquement caractérisées par une progression lente et indolore avec une forte tendance à la récurrence (parfois 30 ans après le premier traitement) associée à un très mauvais pronostic, avec 80% de décès.

B. Projet

1. Génération d'un modèle d'étude de cellules de la granulosa

L'étude de la mutation C134W nécessite la génération d'un modèle humain à partir d'une lignée cellulaire hétérozygote pour la mutation. En effet, il n'existe pas dans le commerce de lignée cellulaire n'exprimant que *FOXL2* WT. Le choix s'est donc porté sur les cellules KGN (304), lignée dérivée d'un carcinome de la granulosa humaine possédant un caryotype anormal [45, XX, 7q-, -22], hétérozygotes pour la mutation C134W. Ces cellules ont été modifiées par CRISPR/Cas9 afin d'obtenir des clones homozygotes et hémizygotés pour l'allèle WT et l'allèle muté.

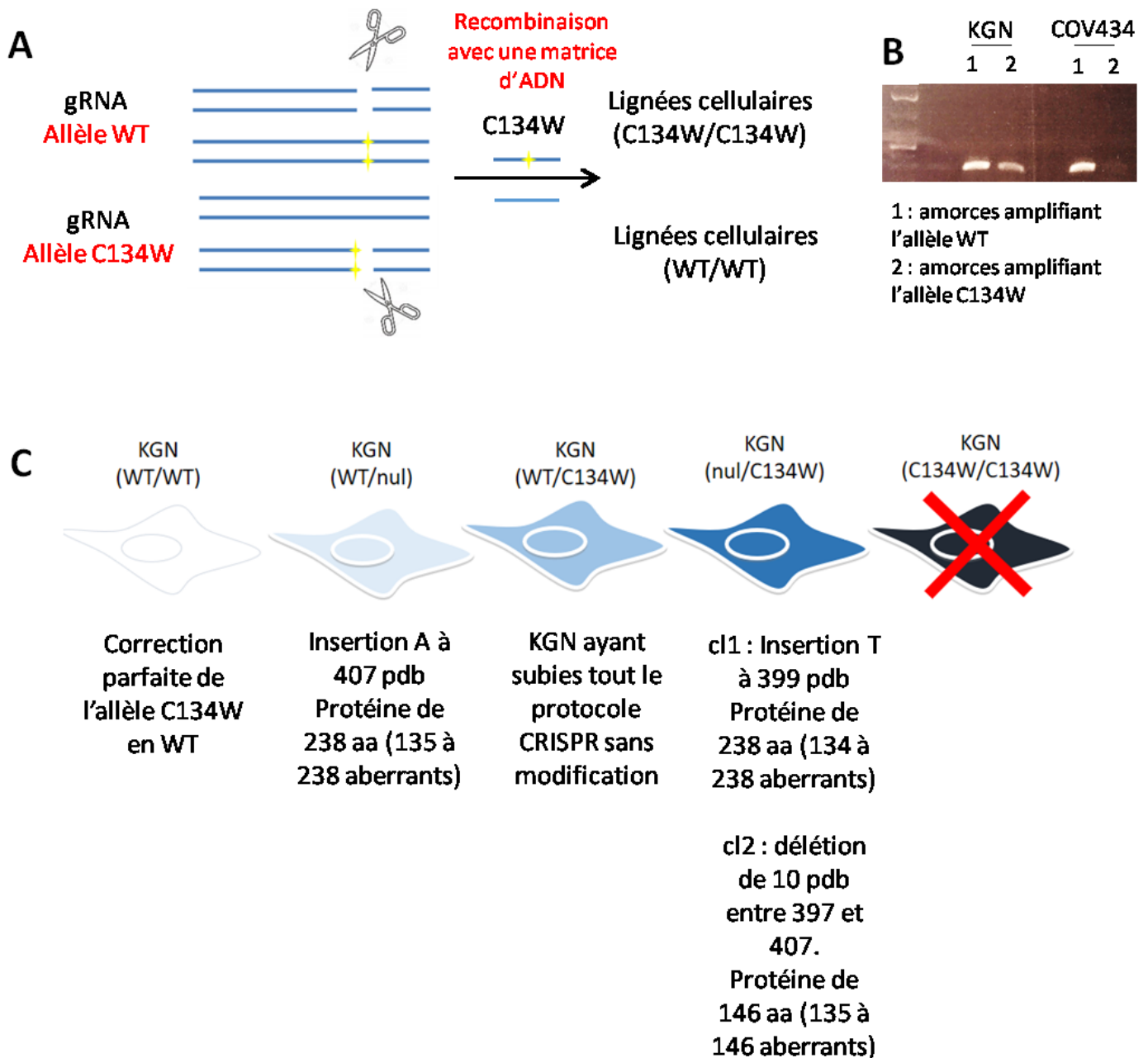


Figure 30 : **Stratégie CRISPR utilisée et clones obtenus**

A. Stratégie CRISPR utilisée avec deux ARN guides différents l'un reconnaissant l'allèle sauvage et l'autre reconnaissant l'allèle muté. La coupure induite par la Cas9 est alors allèle spécifique. Les cellules sont mises en présence d'une matrice d'ADN simple brin possédant la séquence sauvage ou mutante afin d'obtenir des lignées homozygotes pour chacun des deux allèles.

B. PCR "allèle spécifique" mise au point sur des cellules KGN hétérozygotes et des cellules COV434 homozygotes sauvages pour FOXL2 ne permettant d'amplifier qu'un des deux allèles.

C. Représentation schématique des clones CRISPR obtenus et description des mutations obtenues sur la séquence de FOXL2 et conséquences aux niveaux protéiques.

a) Stratégie CRISPR utilisée

La lignée KGN utilisée présente un allèle de FOXL2 sauvage et un allèle portant la mutation oncogénique. Dans le but d'obtenir des lignées homozygotes, nous avons choisi d'utiliser la méthodologie CRISPR/Cas9 associé à la réparation par recombinaison homologue de l'ADN coupé. J'ai donc designé deux ARN guides indépendants, l'un ciblant l'allèle WT, afin de le couper puis d'obtenir une réparation par intégration d'un G en position 402 et l'autre ciblant l'allèle p.C134W afin de le couper puis d'obtenir une réparation par intégration d'un C à la même position (Figure 30A). Lors de la transfection avec l'ARN guide et la Cas9, les cellules ont également été mises en présence d'une matrice ADN simple brin (ou ssODN) de 100 pb centrée sur la mutation C.402>G possédant soit la base C de l'allèle de référence soit la base G correspondant à la mutation oncogénique (Figure 30A), permettant la réparation par recombinaison homologue.

Une fois transfectée, les cellules ont été triées par cytométrie en flux. Les cellules transfectées (exprimant l'OFP contenu dans le plasmide permettant l'expression de la Cas9 et de l'ARN guide), sont récupérées puis diluées de façon à obtenir une cellule par puits de plaque 96 puits. Les cellules ont été incubées avec du milieu déjà partiellement consommé par des KGN afin de fournir aux cellules les facteurs de croissances nécessaires. Après deux à trois semaines de croissances les clones sont passés en plaque 24 puits pour les amplifier et réaliser une extraction d'ADN génomique. Une stratégie de PCR allèle spécifique a été mise au point pour détecter sur l'ADN génomique la présence de l'allèle sauvage ou mutant de façon indépendante (Figure 30B). La PCR a été mise au point sur des cellules KGN non modifiées (possédant les deux allèles de FOXL2) et des cellules COV434 (305) (cellules de la granulosa ovarienne homozygotes sauvages pour FOXL2), comme témoins positif et négatif respectivement. Seuls les clones ne présentant de bandes que pour l'un ou l'autre couple d'allèle ont été envoyés à séquencer, par Sanger classique, en sens puis en anti-sens. Les séquençages dans les deux sens ont été analysés « à la main » afin de différencier les deux allèles et de connaître la séquence de l'allèle non modifié.

b) Caractérisations génétiques des clones

Deux clones (WT/WT) pour FOXL2 ont été obtenus. L'unique clone (WT/-) possède un allèle WT et un allèle tronqué, avec un stop précoce au 238^{ème}aa (au lieu de 377 aas) dû à l'insertion d'un A environ 3 pb après la mutation oncogénique. Les deux clones WT/C134W possède un allèle « C134W » intact et un allèle sauvage tronqué (soit au 238^{ème}aa, en raison de l'insertion d'un T juste avant le C.402 sauvage, soit au 146^{ème}aa, suite à une délétion de 10 pb juste avant le C.402 sauvage)

(Figure 30C). Les clones (WT/C134W) sont des cellules ayant été transfectées avec le plasmide CRISPR mais n'ayant pas subi de modification, ils sont comme pour les autres clones issus d'une expansion clonale. Aucun clone C134W/C134W n'a été obtenu soit en raison d'un screening de clones trop faible, soit en raison d'une létalité ou d'un énorme défaut de croissance de cellules associées à l'état homozygote de la mutation.

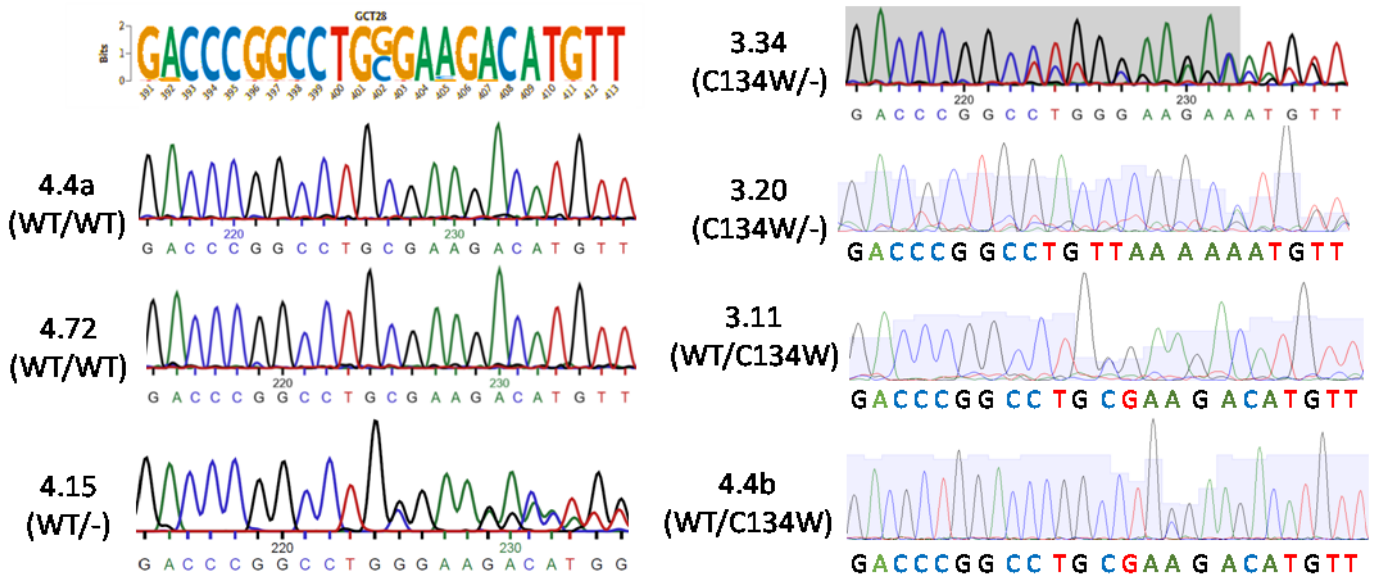


Figure 31 : **Séquençage de l'ADNc des différents clones KGN obtenus.**

Chromatogramme du séquençage après transcription reverse (ADNc) de la région portant la mutation C.402>G pour chaque clone obtenu. Les génotypes associés sont notés sous le nom de chaque clone.

Une fois les clones obtenus, j'ai vérifié l'expression de *FOXL2* par séquençage de l'ADNc. Les séquençages sens obtenus pour chaque clone sont présentés en Figure 31. Lorsqu'il y a deux allèles différents ils sont bien visibles sur les séquençages des ADNc, montrant qu'ils sont transcrits et détectables en ARN. Même si ce n'est pas une preuve que les allèles soient exprimés au même niveau, l'allèle oncogénique reste détectable au niveau ARN, en cohérence avec les données présentées dans la Figure 22 de l'introduction.

Il n'a pas été possible de détecter *FOXL2*-WT, *FOXL2*-C134W et les formes tronquées à partir d'extrait de protéines totales issues des KGN par Western blot. L'expression des facteurs de transcription est souvent limitée à un niveau basale ce qui pourrait expliquer l'absence de détection. Néanmoins les cellules KGN sont connues pour exprimer *FOXL2* et maintenir une inhibition de l'expression de *Sox9*. De plus les clones présentaient lors de leur extension des caractéristiques morphologiques propres à chaque phénotype (voir partie 3) suggérant que *FOXL2* était bien exprimé dans ces cellules et que sa mutation ou son absence induit un phénotype remarquable.

Les formes tronquées de *FOXL2* ont été transfectées en surexpression dans des cellules HFF (à haut potentiel de transfection). Toutes ces formes sont exprimées, sauf la forme la plus tronquée (associée à la délétion de 10 pb) laissant envisager que ces protéines *FOXL2* pourrait encore agir en FT. Néanmoins dans les syndromes BPES, certains patients présentent des mutations de *FOXL2* avec une partie 5' du gène non affectée et un stop précoce tout à fait similaire à nos clones. Ces patients sont décrits comme ayant une haploinsuffisance de *FOXL2*. Ceci laisse supposer que les formes tronquées obtenues par CRISPR auraient une activité réduite. L'obtention d'un nouveau clone WT/- pour lequel on serait sûrs que la protéine *FOXL2* ne peut être exprimée à partir de l'allèle « nul » permettrait de comparer les activités.

2. Analyses à haut-débit et pistes d'études dans le rôle de la mutation C134W

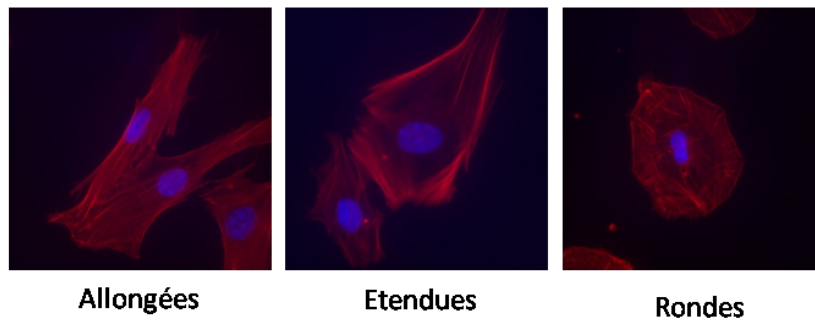
Afin d'étudier le rôle de la mutation p.C134W sur la régulation des gènes cibles de FOXL2, les ARNm des clones WT/C134W et WT/WT ont été envoyés pour analyses des gènes DE en RNA-seq. La mutation étant retrouvée principalement à l'état hétérozygote chez les patientes, ces clones sont représentatifs des cellules de la granulosa saine et tumorale. Une comparaison de l'expression des gènes ayant un Fold Change supérieur ou inférieur à 1,5 montre que 791 gènes sont down-régulés et 605 gènes sont up-régulés dans la condition WT/C134W par rapport aux clones WT/WT. Si l'on s'intéresse à l'ensemble des gènes DE, la recherche d'enrichissements dans les bases de données KEGG, ou encore Réactome met en lumière différentes voies de signalisation relatives à la matrice extracellulaire, ou encore l'adhésion focale (Table 4). De façon intéressante, les gènes DE liés à l'organisation de la matrice extracellulaire sont majoritairement down-régulés (48 vs 9) ainsi que les gènes DE impliqués dans l'adhésion focale avec 27 gènes down-régulés contre 3 up-régulés.

Table 4 : Processus cellulaire dépendant de FOXL2-C134W

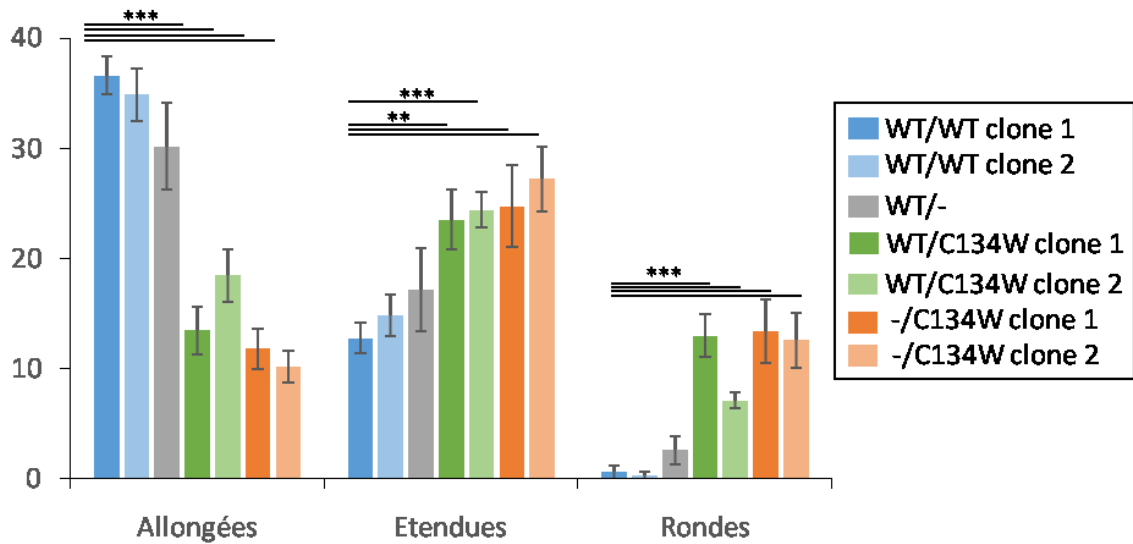
La liste de gènes (cibles de FOXL2 C134W) a été analysé par KEGG (en bleu) and REACTOME (en vert) pour recherche de termes enrichis parmi les processus cellulaire. Seuls les termes enrichis avec une p-value corrigée par Bonferroni < 0.005 ont été conservés.

	Pathway	Gènes observés	Gènes référencés	Pvalue	Pvalue ajustée
Réactome	Extracellular matrix organization Homo sapiens R-HSA-1474244	57	283	$2,67.10^{-13}$	$4,08.10^{-10}$
	Collagen biosynthesis and modifying enzymes Homo sapiens R-HSA-1650814	19	63	$3,03.10^{-8}$	$2,32.10^{-5}$
	Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures Homo sapiens R-HSA-2022090	16	54	$4,86.10^{-7}$	$2,48.10^{-4}$
	Collagen formation Homo sapiens R-HSA-1474290	19	85	$4,80.10^{-6}$	0,00183
	Non-integrin membrane-ECM interactions Homo sapiens R-HSA-3000171	12	42	$1,97.10^{-5}$	0,00604
	ECM proteoglycans Homo sapiens R-HSA-3000178	13	55	$8,07.10^{-5}$	0,02057
KEGG	ECM-receptor interactions	18	82	$1,11.10^{-5}$	0,0034
	Protein digestion and absorption	19	90	$1,16.10^{-5}$	0,00178
	Focal adhesion	30	199	$5,31.10^{-5}$	0,0054

A



B



C

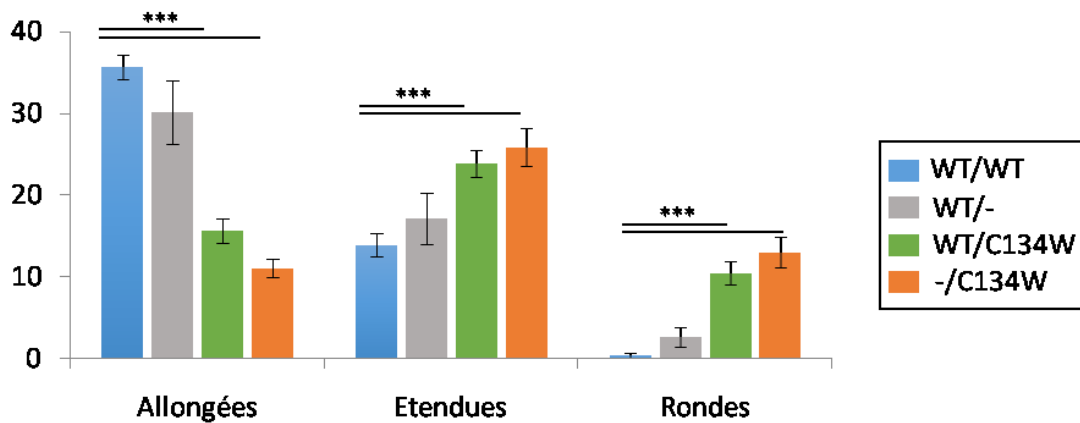


Figure 32 : **Phénotypes morphologiques des clones CRISPR mutés pour FOXL2**

A. Images représentatives des trois phénotypes morphologiques distincts observés dans les différents clones CRISPR. Cellules KGN marquées au DAPI (1/2000^{ème}) et à la phalloïdine (1/1000^{ème}) pour marquage de l'actine F. Trois phénotypes distincts sont observés : cellules allongées, cellules étendues et cellules rondes.

B. Répartition des cellules suivant les trois phénotypes pour chaque clone CRISPR obtenu. Analyses statistiques de Student avec comme p-value, **<0,01 et ***<0,001.

C. Répartition des cellules suivant les trois phénotypes décrits en panel A pour chaque génotype.

3. La mutation C134W affecte-t-elle la migration des cellules de la granulosa ?

Dans l'article 1, nous avons mis en évidence le rôle de FOXL2 dans la régulation de gènes impliqués dans la migration, l'adhésion cellulaire et l'invasion. Cette régulation, notamment *via PHACTR1*, affecte la migration et l'invasion des cellules de la granulosa murine et humaine. En cohérence avec les résultats obtenus pour le RNA-seq de nos clones, nous avons voulu savoir si la mutation oncogénique pourrait être associée à un phénotype particulier en lien avec la migration et l'adhésion.

a) La mutation C134W est associée à un changement conformationnel de la cellule.

Lors du screening des clones en plaques 96 puits j'ai remarqué que certains clones présentaient des phénotypes morphologiques différents des cellules KGN initiales. Ces phénotypes semblant corrélés avec les génotypes présentés ci-dessus, nous avons souhaité les quantifier par des tests. Pour cela, les cellules ont étéensemencées sur lamelle puis fixées 24h après à environ 50% de confluence. Un marquage DAPI (au 1/2000^{ème}) et Phalloïdine (à 1/1000^{ème}) ont ensuite été réalisés. Un total de 150 cellules (soit deux ou trois images au grossissement 20X) par condition a été analysé. Trois phénotypes différents ont été observés et comptabilisés pour chaque condition (Figure 32A) : des cellules allongées, des cellules étendues et des cellules rondes. Les résultats ont d'abord été analysés pour chaque clone (Figure 32B). Une tendance nette se détache pour les cellules possédant l'allèle sauvage, plus allongées et beaucoup moins rondes, par rapport à des cellules possédant l'allèle C134W qui sont beaucoup plus rondes. Les clones de même génotype possèdent une répartition des trois phénotypes similaire, excepté les deux clones WT/C134W. En effet le clone 1 possède un peu moins de cellules allongées et un peu plus de cellules rondes que le clone 2, mais cette différence n'est significative qu'avec les cellules rondes (p-value de 0,02). En cohérence avec ces observations, la même analyse réalisée cette fois-ci en regroupant les clones de même génotype reste statistiquement significative (Figure 32C). Il est intéressant de noter que la présence de l'allèle C134W à l'état hétérozygote ou hémizyote semble être associée à l'acquisition d'une forme cellulaire particulière.

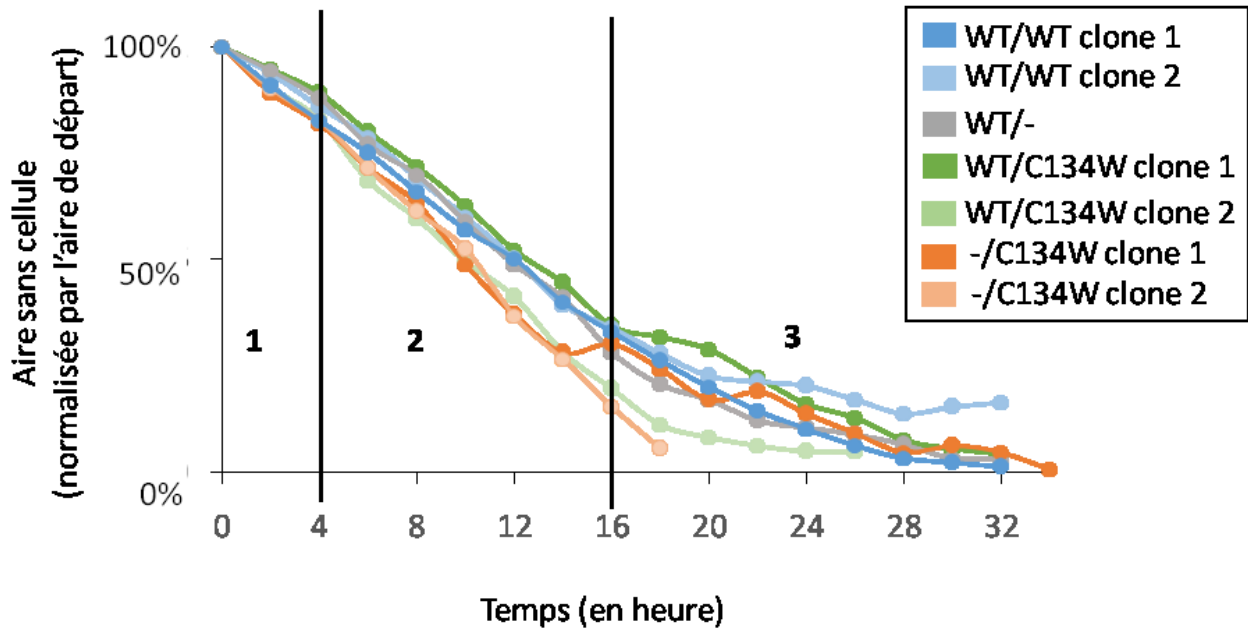


Figure 33 : Analyse de la migration des clones CRISPR

On observe trois phases de migration : 1. Les cellules migrent doucement. 2. Phase de migration linéaire avec une accélération de la vitesse pour tous les clones. 3. Un ralentissement de la fermeture à la fin.

b) La mutation C134W est-elle associée à un défaut de migration ?

En raison des différences phénotypiques conservées entre les clones et suite aux résultats obtenus dans l'[article 1](#) sur le rôle de FOXL2 dans la migration des cellules de la granulosa, nous avons regardé si les clones présentaient des profils de migration différents en lien avec leur génotype. Les cellules ont étéensemencées de telle sorte à être à confluence lors de l'expérience, puis le scratch a été réalisé en triplicat. Des images sont prises toutes les deux heures sur le même champ de façon automatique permettant de suivre la fermeture de la blessure au fil du temps (Figure 33).

Tous les clones ont été analysés de façon indépendante, en triplicat avec au moins un champ d'observation par puits. Les clones d'un même génotype semblent se comporter de façon assez similaire sur le début de la phase migration (de 0 à 14h) excepté les deux clones WT/C134W. Puis la fin de la migration (fermeture totale de la blessure) varie d'un clone à l'autre.

Pour la majorité des clones, il apparaît trois phases de migration distinctes, une première de 0 à 4h, une seconde de 4h à 16h et une dernière après 16 heures de migration. Dans la première phase, les cellules semblent avoir une migration ralentie qui s'accélère à partir de 4h et qui se maintient de façon très linéaire. Puis à partir de 16 heures de migration, celle-ci semble ralentir.

Les résultats présentés dans la Figure 33, restent cependant difficilement interprétables mais peuvent fournir un élément de base pour la poursuite de l'étude de la migration des clones. En effet, comme cela a été détaillé précédemment, il est possible que le scratch ne soit pas la façon optimale d'étudier la migration. La présence de trois phases de migrations laisse imaginer que plusieurs mécanismes interviennent dans la migration des clones telles que la réponse à la blessure dans un premier temps puis l'interprétation des signaux venant du front de cellules opposé. Dans notre cas il apparaît cohérent de réaliser un essai de migration avec un seul front (avec barrière de PDMS) afin de supprimer la blessure infligée aux cellules et l'attirance ou la répulsion de cellules présentes sur un front opposé.

4. FOXL2 C134W et l'interaction avec ses partenaires

En 2011, lors de l'identification de nouveaux partenaires de FOXL2, une caractérisation de l'effet de chacun de ces partenaires sur l'activation transcriptionnelle par FOXL2 de 15 promoteurs rapporteurs a été réalisée (279). Cette étude a permis de montrer que la version mutante p.C134W de FOXL2 modifie l'effet hyperactivateur notamment de GMEB1 et CREM, avec une augmentation pour GMEB1 et une perte pour CREM (Figure 23). De plus, alors que FOXL2 WT peut induire

l'apoptose en synergie avec NR2C1, GMEB1 et SP100, le mutant p.C134W présente un défaut d'induction de l'apoptose. Ces résultats suggèrent que FOXL2 p.C134W présente un défaut d'intégration des signaux pro-apoptotiques *via* un défaut d'interaction avec certains de ces partenaires mais le mécanisme reste à élucider. Une étude à l'échelle du protéome, similaire à celle réalisée pour FOXL2 et présentée dans [l'article 2](#), pourrait apporter des pistes sur de nouveaux partenaires associées uniquement à la forme C134W.

C. Discussion et perspectives

1. Mutation oncogénique et défaut d'invasion et d'adhésion

Bien que la migration reste une piste intéressante à creuser, il apparaît que le caractère invasif et la capacité des clones à adhérer soient également des phénotypes intéressants à étudier. En effet, les cellules tumorales peuvent présenter des défauts dans ces deux processus. Ces études seront réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites dans [l'article 1](#) et devraient fournir des pistes intéressantes sur le rôle associé à la mutation oncogénique.

2. Analyse des clones WT/- et C134W/-

En souhaitant générer des clones homozygotes pour FOXL2 (sauvage ou mutant) nous avons obtenus des clones possédant un des deux allèles tronqués (clones où la coupure par la Cas9 n'a pas été réparée par recombinaison homologue avec la matrice mais uniquement par jonction d'extrémité non homologue (ou NHEJ pour non-homologous end-joining en anglais). Ces clones ont été envoyés à séquencer par RNA-seq en même temps que les clones WT/WT et WT/C134W. Cependant leur analyse nécessite l'obtention d'au moins un autre clone WT/- pour FOXL2. En effet, l'objectif de l'obtention d'un nouveau clone WT/- pour FOXL2 est double. Cela permettra, dans un premier temps, d'obtenir des résultats statistiquement exploitables en ayant plusieurs clones de génotype WT/-. Dans un second temps, le but est d'obtenir un clone dont la coupure CRISPR surviendrait de manière très précoce dans la séquence de FOXL2, permettant d'obtenir un clone réellement hémizygote. En effet, pour le clone WT/- précédemment obtenu, toute la partie 5' de FOXL2 n'était pas affectée, donnant une protéine FOXL2 partielle, de 238 acides aminés (en comparaison des 376 acides aminés constituant la séquence protéique de FOXL2).

Ces clones pourraient servir de modèle d'étude du rôle de FOXL2 dans le syndrome du BPES. Enfin ces clones permettraient de réaliser des études sur les partenaires de deux formes de FOXL2 de façon indépendante (détaillée ci-après) mais aussi sur la reconnaissance de la chromatine associée à chacune de ces deux formes, permettant une exploration poussée du rôle de FOXL2 C134W dans la régulation de l'expression génique.

III. Discussion générale et perspectives

A. *FOXL2* : un rôle dans un grand nombre de processus cellulaires dans les cellules de la granulosa

Mon travail de thèse met en évidence la complexité de la régulation transcriptionnelle par les FT, *via* l'exemple de *FOXL2*, le FT majeur des cellules de la granulosa. Depuis 2004, *FOXL2* est décrit comme ayant un rôle majeur dans ce type cellulaire et principalement dans le maintien de ces dernières (116, 195). Cependant, les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis d'élargir les connaissances sur la régulation transcriptionnelle exercée par *FOXL2*. L'utilisation de cellules primaires de la granulosa murine couplée à deux KD de temps différents de *Foxl2*, permettant d'identifier à la fois les cibles directes et indirectes de *FOXL2*, ont fourni un nombre important de cibles de *FOXL2* (1001 gènes) jusqu'ici jamais atteint.

Cette abondance de données a permis d'identifier de nouveaux rôles putatifs de *FOXL2* et notamment une implication dans la voie PI3K/AKT et dans des processus impliqués dans la migration cellulaire et l'invasion. Cependant bien d'autres voies restent à explorer comme l'implication dans le cycle cellulaire ou la résistance à l'insuline. En effet bien que l'ovaire ne soit pas un tissu cible évident pour l'action de l'insuline, il existe de nombreuses preuves suggérant que l'insuline affecte le métabolisme du glucose, la stéroïdogenèse et la croissance/différenciation cellulaire, et que ces effets sont pertinents à la fois pour la physiologie ovarienne normale et pour les troubles de la fonction ovarienne. L'hyperinsulinémie et l'insulinorésistance sont d'ailleurs des caractéristiques reconnues du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) (306). Il est montré que l'augmentation, dans les cellules de la granulosa, de l'action de l'hormone lutéinisante (LH) par l'insuline est impliquée dans le mécanisme d'arrêt du développement des follicules, caractéristique de l'anovulation dans le SOPK (307). Ces études très récentes et nos résultats de RNA-seq laissent envisager que *FOXL2* jouerait un rôle dans ces processus.

L'identification de gènes impliqués dans la migration cellulaire, l'adhésion et l'invasion, nous a poussés à étudier plus en détail ces voies dans le cas du KD *Foxl2*. Nous avons vu que les cellules de la granulosa possédaient des capacités migratoire, invasive et adhésive réduites en absence de *FOXL2*. Ces rôles sont entièrement nouveaux et étaient jusqu'ici insoupçonnés. La migration cellulaire dirigée est importante pour de nombreux aspects du développement normal des animaux. Dans le follicule

ovarien primordial, et plus tard dans le développement du follicule, les cellules de la granulosa progressent pour former un cumulus oophorus, multicouche entourant l'ovocyte dans la phase préovulatoire ou antrale. En effet, la formation d'un follicule préovulatoire en réponse à la FSH nécessite des changements spectaculaires dans le follicule, notamment une augmentation de la taille du follicule et du nombre de cellules de la granulosa, la différenciation de ces cellules et la formation d'un antrum. Des modifications dans la morphologie, l'adhésion et la migration des GC peuvent alors altérer la formation du follicule et tous les processus menant à une ovulation correcte. Notre étude se base sur des données haut-débit issues de cellules de la granulosa isolées. Cependant la folliculogénèse est le résultat d'un dialogue constant entre l'ovocyte et les cellules somatiques environnantes. Il pourrait être intéressant d'étudier les GC dans un ensemble tri-dimensionnel, en organoïdes. Le rôle de FOXL2 pourrait alors être étudié sur la capacité qu'ont les GC à s'organiser entre elles. L'étude du follicule et de son développement commence à être réalisée dans des organoïdes (308). Cependant on l'a vu dans l'introduction, le développement du follicule est le résultat d'un dialogue entre les CG et les cellules somatiques en plus d'un équilibre hormonal très fin. FOXL2 étant impliqué dans un grand nombre de processus dans le développement des GC, il n'est pas exclu que sa délétion dans un modèle organoïde soit trop délétère pour obtenir un modèle d'étude viable.

Au delà du simple rôle transcriptomique de FOXL2 nous avons également voulu montrer que FOXL2 se fixe à la chromatine et que cette fixation induit une réponse transcriptionnelle. Nous avons couplé notre étude à une analyse des domaines topologiques où FOXL2 se fixe entraînant la dérégulation d'un gène. Ainsi, plus de la moitié des gènes régulés par FOXL2 se trouvent dans cette conformation malgré l'identification d'un nombre restreint de pics. Encore, plus intéressant dans la majorité des cas si plusieurs gènes se trouvent dans un même TAD, les gènes sont régulés dans le même sens par FOXL2. Parmi ces gènes, et de façon assez attendu, on retrouve des cibles déjà connues de FOXL2, comme *Cyp19a1* et *Esr2* notamment, mais aussi des cibles décrites pour jouer un rôle dans la migration dont *Phactr1*. L'[article 1](#), décrit l'action de FOXL2 en co-opération avec ESR2 sur l'activation de *Phactr1* mais un grand nombre d'autres cibles restent inexploitées et pourraient apporter de nouvelles informations sur le rôle de FOXL2 dans le développement du follicule et l'action de cellules de la granulosa dans ce processus. D'un point de vue pathologique, les données accumulées dans l'[article 1](#) et l'implication de FOXL2 dans les processus de migration et d'invasion apportent de nouvelles pistes sur le rôle de FOXL2 dans les AGCTs. En effet ces processus sont impliqués à la fois dans la tumorigénèse mais aussi dans les métastases.

B. FOXL2 : une régulation complexe

La régulation de l'expression de FOXL2 est assez peu décrite. FOXL2 est connu pour être modifiée post-traductionnellement et sa SUMOylation, notamment, est nécessaire pour sa stabilisation et l'activation de certaines cibles transcriptionnelles (257). Une régulation de sa stabilité est aussi décrite *via* GSK3 (309), phosphorylant la S33 induisant ainsi une diminution de l'activité fonctionnelle de FOXL2. Notre étude de la régulation de FOXL2 par AKT, montre que, probablement de façon indirecte, AKT inhibe l'action de FOXL2 (activatrice ou inhibitrice) sur la régulation d'un certain nombre de gènes (22 dans notre étude). Cette action d'AKT est confirmée à la fois sur certains promoteurs artificiels mais aussi, de façon indirecte, *via* l'effet d'AKT et de FOXL2 sur la migration des cellules de la granulosa. En effet, dans l'[article 1](#) et l'[article 3](#) (présenté en Annexe), nous avons montré que FOXL2 antagonise le rôle d'AKT sur la migration de ces cellules. Dans ce cas là, la régulation de l'activité de FOXL2 par AKT ne passe probablement pas par l'action de GSK3. En effet, AKT inactivant GSK3, son action devrait être associée à une stabilisation de FOXL2 (309) ce qui ne concorde pas avec les phénotypes migratoires observés. La caractérisation de cette régulation, en identifiant les protéines intermédiaires et les résidus de FOXL2 impliqués, ajouterait un niveau de complexité à la régulation de FOXL2 mais fournirait surtout des pistes d'études très intéressantes sur l'étiologie des JGCTs et des AGCTs qui sont chacune caractérisée par des mutations soit dans AKT soit dans FOXL2 respectivement.

C. FOXL2 et ses partenaires dans la régulation de la transcription et dans la tumorigénèse

L'analyse du rôle de FOXL2 et de ses partenaires, a été principalement centrée sur le rôle conjoint avec ESR2. Cette analyse prend racine sur des données déjà publiées au laboratoire (118) et apporte un nouvel éclairage, fournissant à la fois 153 cibles communes régulées par les deux partenaires et montrant que la fixation de FOXL2 ou sa stabilisation sur un grand nombre de loci nécessite la présence d'ESR2. Ces données de RNA-seq et de CHIP-seq croisées avec les TAD et les informations recueillies sur la régulation par FOXL2 nous ont fourni un nombre restreint mais très intéressant de cibles communes à FOXL2 et ESR2 parmi lesquelles des gènes impliqués dans la migration cellulaire. L'action combinée de FOXL2 et ESR2 a été montrée sur la régulation de l'expression de *Phactr1* et ouvre là encore une voie intéressante dans le rôle de ces deux FT dans le fonctionnement de l'ovaire. Les phénotypes assez similaires observés chez les souris KO pour *Foxl2* et *Esr2* pourraient s'expliquer *via* la régulation de cibles communes à ces deux partenaires.

L'analyse d'autres partenaires aux mêmes niveaux de détails restent nécessaire pour comprendre l'ensemble des actions de FOXL2 et leurs interdépendances. Parmi eux TRIM28 et SMAD3 sont des pistes de recherches intéressantes. Si l'étude de TRIM28 est très récente, le rôle de SMAD3 dans les cellules de la granulosa n'est plus à démontrer (199, 276, 277). La régulation *via* SMAD3 est d'autant plus intéressante que c'est un partenaire connu des protéines FOXO, jouant un rôle dans le développement folliculaire. D'ailleurs l'activation de l'expression de SMAD3 *via* le KD de *Foxo1/Foxo3* et *Pten* est associée à un développement de GCT dans 65% des femelles (229). L'étude du rôle de SMAD3 ouvre donc une piste intéressante vers la caractérisation de la mutation C134W. En 2019, Belli et *al.* (310) montrent que FOXL2-C134W, mais pas FOXL2-WT, induit l'expression de CYP19A1 uniquement en présence d'activine A ou lors d'une surexpression de SMAD3. De plus, la liaison du couple FOXL2-C134W/SMAD3 à l'élément de liaison FOX (FBE) situé à 2199 pb en amont du codon d'initiation ATG de CYP19A1 humain est plus stable dans le temps que celle de FOXL2-WT. Ces observations nous confortent dans l'analyse du couple FOXL2/SMAD3 et nous poussent à nous interroger sur leurs interactions et leurs actions sur la transcription dans le contexte d'un ovaire sain ou cancéreux. Les clones KGN (WT/-) et (C134W/-) fournissent un bon modèle d'études pour chacune de ces deux protéines dans le contexte des cellules de la granulosa. Dans ces clones, l'activation de SMAD3 *via* l'Activine A et l'impact sur les cibles transcriptionnelles pourraient être étudiées en association avec des CHIP de SMAD3 et de FOXL2 pour mener une étude similaire à celle présentée dans l'article 1. L'interaction différentielle entre la forme WT et la forme C134W avec un ou plusieurs partenaires pourrait être une piste expliquant que la mutation C134W n'implique pas de perte de fonction globale de FOXL2 et n'entraîne pas la perte d'identité des cellules de la granulosa. La régulation transcriptionnelle *via* FOXL2 pourrait donc être assimilée à un partenaire/une action, l'affinité de FOXL2 pour un site de fixation pourrait alors être régie par la présence de ce partenaire. Ce genre de modèle pourrait expliquer comment des facteurs d'une même famille, comme les FT FOX détaillés dans l'introduction, agissent sur autant de processus cellulaires et moléculaires.

Références bibliographiques

1. S. L. Klemm, Z. Shipony, W. J. Greenleaf, Chromatin accessibility and the regulatory epigenome. *Nat. Rev. Genet.* **20**, 207–220 (2019).
2. M. Lambert, S. Jambon, S. Depauw, M.-H. David-Cordonnier, Targeting Transcription Factors for Cancer Treatment. *Molecules* **23** (2018).
3. T. Caspersson, J. Schultz, Pentose Nucleotides in the Cytoplasm of Growing Tissues. *Nature* **143**, 602–603 (1939).
4. J. Brachet, La localisation des acides pentosenucléiques dans les tissus animaux et les œufs d'amphibiens en voie de développement. *Archives de biologie, vol.53*, 207–257 (1942).
5. J. Brachet, Recherches sur les interactions biochimiques entre le noyau et le cytoplasme chez les organismes unicellulaires: I. *Amoeba proteus*. *Biochimica et Biophysica Acta* **18**, 247–268 (1955).
6. F. Jacob, J. Monod, Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology* **3**, 318–356 (1961).
7. A. B. Pardee, F. Jacob, J. Monod, The genetic control and cytoplasmic expression of “Inducibility” in the synthesis of β -galactosidase by *E. coli*. *Journal of Molecular Biology* **1**, 165–178 (1959).
8. R. Arditti, T. Grodzicker, J. Beckwith, Cyclic adenosine monophosphate-independent mutants of the lactose operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **114**, 652–655 (1973).
9. E. Brickman, L. Soll, J. Beckwith, Genetic characterization of mutations which affect catabolite-sensitive operons in *Escherichia coli*, including deletions of the gene for adenyl cyclase. *J. Bacteriol.* **116**, 582–587 (1973).
10. S. Hahn, E. T. Young, Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics* **189**, 705–736 (2011).
11. M. C. Thomas, C.-M. Chiang, The general transcription machinery and general cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 105–178 (2006).
12. E. Nudler, RNA Polymerase Active Center: The Molecular Engine of Transcription. *Annu Rev Biochem* **78**, 335–361 (2009).
13. G. Orphanides, G. LeRoy, C. H. Chang, D. S. Luse, D. Reinberg, FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell* **92**, 105–116 (1998).
14. J. L. Manley, D. C. Di Giammartino, “mRNA Polyadenylation in Eukaryotes” in *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*, W. J. Lennarz, M. D. Lane, Eds. (Academic Press, 2013), pp. 188–193.

15. N. A. Faustino, T. A. Cooper, Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* **17**, 419–437 (2003).
16. S. M. Berget, C. Moore, P. A. Sharp, Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 3171–3175 (1977).
17. K. Calame, *et al.*, Mouse Cmu heavy chain immunoglobulin gene segment contains three intervening sequences separating domains. *Nature* **284**, 452–455 (1980).
18. D. Schmucker, *et al.*, Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* **101**, 671–684 (2000).
19. F. E. Baralle, J. Giudice, Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 437–451 (2017).
20. M. Uhlén, *et al.*, Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347** (2015).
21. J. H. Laity, B. M. Lee, P. E. Wright, Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 39–46 (2001).
22. E. Wingender, Criteria for an updated classification of human transcription factor dna-binding domains. *J. Bioinform. Comput. Biol.* **11**, 1340007 (2013).
23. R. T. Wintjens, M. J. Rooman, S. J. Wodak, Automatic classification and analysis of alpha alpha-turn motifs in proteins. *J. Mol. Biol.* **255**, 235–253 (1996).
24. W. J. Gehring, *et al.*, Homeodomain-DNA recognition. *Cell* **78**, 211–223 (1994).
25. T. D. Littlewood, G. I. Evan, Transcription factors 2: helix-loop-helix. *Protein Profile* **2**, 621–702 (1995).
26. T. D. Schneider, R. M. Stephens, Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6097–6100 (1990).
27. G. D. Stormo, Y. Zhao, Determining the specificity of protein-DNA interactions. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 751–760 (2010).
28. J. M. Vaquerizas, S. K. Kummerfeld, S. A. Teichmann, N. M. Luscombe, A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 252–263 (2009).
29. M. T. Weirauch, *et al.*, Determination and inference of eukaryotic transcription factor sequence specificity. *Cell* **158**, 1431–1443 (2014).
30. A. Khan, *et al.*, JASPAR 2018: update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic Acids Res.* **46**, D1284 (2018).
31. I. V. Kulakovskiy, *et al.*, HOCOMOCO: a comprehensive collection of human transcription factor binding sites models. *Nucleic Acids Res.* **41**, D195-202 (2013).
32. G. Badis, *et al.*, Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. *Science* **324**, 1720–1723 (2009).

33. G.-H. Wei, *et al.*, Genome-wide analysis of ETS-family DNA-binding in vitro and in vivo. *EMBO J.* **29**, 2147–2160 (2010).
34. H. Gronemeyer, Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 89–123 (1991).
35. D. S. Johnson, A. Mortazavi, R. M. Myers, B. Wold, Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science* **316**, 1497–1502 (2007).
36. H. S. Kaya-Okur, *et al.*, CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells. *Nat Commun* **10**, 1930 (2019).
37. S. J. Hainer, T. G. Fazio, High-Resolution Chromatin Profiling Using CUT&RUN. *Curr Protoc Mol Biol* **126**, e85 (2019).
38. D. A. Bernstein, Identification of small molecules that disrupt SSB-protein interactions using a high-throughput screen. *Methods Mol. Biol.* **922**, 183–191 (2012).
39. H. Gronemeyer, *et al.*, Progesterone receptors: Isoforms and antihormone action. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **40**, 271–278 (1991).
40. E. Morgunova, J. Taipale, Structural perspective of cooperative transcription factor binding. *Current Opinion in Structural Biology* **47**, 1–8 (2017).
41. L. A. Lettice, *et al.*, A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1725–1735 (2003).
42. K. S. Zaret, J. S. Carroll, Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev.* **25**, 2227–2241 (2011).
43. N. D. Heintzman, *et al.*, Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet.* **39**, 311–318 (2007).
44. J. Dekker, K. Rippe, M. Dekker, N. Kleckner, Capturing chromosome conformation. *Science* **295**, 1306–1311 (2002).
45. A. Denker, W. de Laat, The second decade of 3C technologies: detailed insights into nuclear organization. *Genes Dev.* **30**, 1357–1382 (2016).
46. E. Lieberman-Aiden, *et al.*, Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* **326**, 289–293 (2009).
47. J. R. Dixon, *et al.*, Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* **485**, 376–380 (2012).
48. E. P. Nora, *et al.*, Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature* **485**, 381–385 (2012).
49. J. E. Phillips-Cremins, *et al.*, Architectural protein subclasses shape 3D organization of genomes during lineage commitment. *Cell* **153**, 1281–1295 (2013).
50. O. Symmons, *et al.*, Functional and topological characteristics of mammalian regulatory domains. *Genome Res.* **24**, 390–400 (2014).

51. S. Pott, J. D. Lieb, What are super-enhancers? *Nat. Genet.* **47**, 8–12 (2015).
52. O. Symmons, *et al.*, The Shh Topological Domain Facilitates the Action of Remote Enhancers by Reducing the Effects of Genomic Distances. *Dev. Cell* **39**, 529–543 (2016).
53. F. Le Dily, *et al.*, Distinct structural transitions of chromatin topological domains correlate with coordinated hormone-induced gene regulation. *Genes Dev.* **28**, 2151–2162 (2014).
54. D. Weigel, G. Jürgens, F. Küttner, E. Seifert, H. Jäckle, The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* **57**, 645–658 (1989).
55. D. Weigel, H. Jäckle, The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? *Cell* **63**, 455–456 (1990).
56. E. Lai, *et al.*, HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally. *Genes Dev.* **4**, 1427–1436 (1990).
57. O. J. Lehmann, J. C. Sowden, P. Carlsson, T. Jordan, S. S. Bhattacharya, Fox's in development and disease. *Trends Genet.* **19**, 339–344 (2003).
58. Y. Fan, T. Newman, E. Linardopoulou, B. J. Trask, Gene content and function of the ancestral chromosome fusion site in human chromosome 2q13-2q14.1 and paralogous regions. *Genome Res.* **12**, 1663–1672 (2002).
59. M. J. Anderson, C. S. Viars, S. Czekay, W. K. Cavenee, K. C. Arden, Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics* **47**, 187–199 (1998).
60. P. Carlsson, M. Mahlapuu, Forkhead Transcription Factors: Key Players in Development and Metabolism. *Developmental Biology* **250**, 1–23 (2002).
61. K. L. Clark, E. D. Halay, E. Lai, S. K. Burley, Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* **364**, 412–420 (1993).
62. K. H. Kaestner, W. Knochel, D. E. Martinez, Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* **14**, 142–146 (2000).
63. S. Hannenhalli, K. H. Kaestner, The evolution of Fox genes and their role in development and disease. *Nat Rev Genet* **10**, 233–240 (2009).
64. K. S. Gajiwala, *et al.*, Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature* **403**, 916–921 (2000).
65. L. A. Cirillo, K. S. Zaret, Specific interactions of the wing domains of FOXA1 transcription factor with DNA. *J. Mol. Biol.* **366**, 720–724 (2007).
66. T. Obsil, V. Obsilova, Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene* **27**, 2263–2275 (2008).
67. J. C. Stroud, *et al.*, Structure of the forkhead domain of FOXP2 bound to DNA. *Structure* **14**, 159–166 (2006).

68. J. Seoane, H.-V. Le, L. Shen, S. A. Anderson, J. Massagué, Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* **117**, 211–223 (2004).
69. J. J. Kim, *et al.*, Regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 promoter activity by FKHR and HOXA10 in primate endometrial cells. *Biol. Reprod.* **68**, 24–30 (2003).
70. I. Foucher, M. L. Montesinos, M. Volovitch, A. Prochiantz, A. Trembleau, Joint regulation of the MAP1B promoter by HNF3beta/Foxa2 and Engrailed is the result of a highly conserved mechanism for direct interaction of homeoproteins and Fox transcription factors. *Development* **130**, 1867–1876 (2003).
71. K. E. van der Vos, P. J. Coffey, FOXO-binding partners: it takes two to tango. *Oncogene* **27**, 2289–2299 (2008).
72. M. Penrad-Mobayed, *et al.*, Conventional and unconventional interactions of the transcription factor FOXL2 uncovered by a proteome-wide analysis. *FASEB J.* **34**, 571–587 (2020).
73. S. Wang, S. K. Singh, M. R. Katika, S. Lopez-Aviles, A. Hurtado, High Throughput Chemical Screening Reveals Multiple Regulatory Proteins on FOXA1 in Breast Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci* **19** (2018).
74. D. Sisci, *et al.*, The estrogen receptor α is the key regulator of the bifunctional role of FoxO3a transcription factor in breast cancer motility and invasiveness. *Cell Cycle* **12**, 3405–3420 (2013).
75. H. Huang, *et al.*, Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 1649–1654 (2005).
76. X. Zhang, *et al.*, Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J. Biol. Chem.* **277**, 45276–45284 (2002).
77. A. Brunet, *et al.*, Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol. Cell. Biol.* **21**, 952–965 (2001).
78. A. Brunet, *et al.*, 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J. Cell Biol.* **156**, 817–828 (2002).
79. V. Obsilova, *et al.*, 14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. *Biochemistry* **44**, 11608–11617 (2005).
80. G. Rena, A. R. Prescott, S. Guo, P. Cohen, T. G. Unterman, Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targeting. *Biochem J* **354**, 605–612 (2001).
81. W.-C. Tsai, N. Bhattacharyya, L.-Y. Han, J. A. Hanover, M. M. Rechler, Insulin inhibition of transcription stimulated by the forkhead protein Foxo1 is not solely due to nuclear exclusion. *Endocrinology* **144**, 5615–5622 (2003).
82. M. Aoki, H. Jiang, P. K. Vogt, Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 13613–13617 (2004).

83. E. E. Santo, *et al.*, FOXO3a is a major target of inactivation by PI3K/AKT signaling in aggressive neuroblastoma. *Cancer Res.* **73**, 2189–2198 (2013).
84. U. Alon, Network motifs: theory and experimental approaches. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 450–461 (2007).
85. W. Zhang, *et al.*, ER stress potentiates insulin resistance through PERK-mediated FOXO phosphorylation. *Genes Dev* **27**, 441–449 (2013).
86. S. S. Myatt, E. W.-F. Lam, The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 847–859 (2007).
87. E. Bobrovnikova-Marjon, *et al.*, PERK utilizes intrinsic lipid kinase activity to generate phosphatidic acid, mediate Akt activation, and promote adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 2268–2278 (2012).
88. G. Tuteja, K. H. Kaestner, SnapShot: forkhead transcription factors I. *Cell* **130**, 1160 (2007).
89. G. Tuteja, K. H. Kaestner, Forkhead transcription factors II. *Cell* **131**, 192 (2007).
90. M. L. Golson, K. H. Kaestner, Fox transcription factors: from development to disease. *Development* **143**, 4558–4570 (2016).
91. J. R. Friedman, K. H. Kaestner, The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2317–2328 (2006).
92. M. Hatta, L. A. Cirillo, Chromatin opening and stable perturbation of core histone:DNA contacts by FoxO1. *J. Biol. Chem.* **282**, 35583–35593 (2007).
93. I. Cuesta, K. S. Zaret, P. Santisteban, The forkhead factor FoxE1 binds to the thyroperoxidase promoter during thyroid cell differentiation and modifies compacted chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7302–7314 (2007).
94. W. Dc, *et al.*, The Winged-Helix Transcription Factor HNF-3 Beta Is Required for Notochord Development in the Mouse Embryo. *Cell* **78** (1994) Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8069910/?from_term=Weinstein+foxa2&from_pos=2 [Accessed June 11, 2020].
95. S. L. Ang, J. Rossant, HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* **78**, 561–574 (1994).
96. R. Kittappa, W. W. Chang, R. B. Awatramani, R. D. G. McKay, The foxa2 gene controls the birth and spontaneous degeneration of dopamine neurons in old age. *PLoS Biol.* **5**, e325 (2007).
97. J. Mirosevich, N. Gao, R. J. Matusik, Expression of Foxa transcription factors in the developing and adult murine prostate. *Prostate* **62**, 339–352 (2005).
98. W. Shen, L. M. Scarce, J. E. Brestelli, N. J. Sund, K. H. Kaestner, Foxa3 (hepatocyte nuclear factor 3gamma) is required for the regulation of hepatic GLUT2 expression and the maintenance of glucose homeostasis during a prolonged fast. *J. Biol. Chem.* **276**, 42812–42817 (2001).
99. H. Wan, *et al.*, Foxa2 regulates alveolarization and goblet cell hyperplasia. *Development* **131**, 953–964 (2004).

100. K. A. Lantz, *et al.*, Foxa2 regulates multiple pathways of insulin secretion. *J. Clin. Invest.* **114**, 512–520 (2004).
101. C. Bolte, *et al.*, Expression of Foxm1 transcription factor in cardiomyocytes is required for myocardial development. *PLoS ONE* **6**, e22217 (2011).
102. K. Krupczak-Hollis, *et al.*, The mouse Forkhead Box m1 transcription factor is essential for hepatoblast mitosis and development of intrahepatic bile ducts and vessels during liver morphogenesis. *Dev. Biol.* **276**, 74–88 (2004).
103. V. Ustiyana, *et al.*, Forkhead box M1 transcriptional factor is required for smooth muscle cells during embryonic development of blood vessels and esophagus. *Dev. Biol.* **336**, 266–279 (2009).
104. T. V. Kalin, V. Ustiyana, V. V. Kalinichenko, Multiple faces of FoxM1 transcription factor: lessons from transgenic mouse models. *Cell Cycle* **10**, 396–405 (2011).
105. B. Wang, *et al.*, Foxp1 regulates cardiac outflow tract, endocardial cushion morphogenesis and myocyte proliferation and maturation. *Development* **131**, 4477–4487 (2004).
106. S. Li, D. Zhou, M. M. Lu, E. E. Morrisey, Advanced cardiac morphogenesis does not require heart tube fusion. *Science* **305**, 1619–1622 (2004).
107. W. Shu, *et al.*, Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the Foxp2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 9643–9648 (2005).
108. C. Bacon, *et al.*, Brain-specific Foxp1 deletion impairs neuronal development and causes autistic-like behaviour. *Mol. Psychiatry* **20**, 632–639 (2015).
109. Y. You, *et al.*, Role of f-box factor foxj1 in differentiation of ciliated airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **286**, L650–657 (2004).
110. I. Wierstra, FOXM1 (Forkhead box M1) in tumorigenesis: overexpression in human cancer, implication in tumorigenesis, oncogenic functions, tumor-suppressive properties, and target of anticancer therapy. *Adv. Cancer Res.* **119**, 191–419 (2013).
111. H. Ye, *et al.*, Hepatocyte nuclear factor 3/fork head homolog 11 is expressed in proliferating epithelial and mesenchymal cells of embryonic and adult tissues. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1626–1641 (1997).
112. A. Rada-Iglesias, Pioneering barren land: mitotic bookmarking by transcription factors. *Dev. Cell* **24**, 342–344 (2013).
113. S. Z. Josefowicz, L.-F. Lu, A. Y. Rudensky, Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–564 (2012).
114. M. A. Gavin, *et al.*, Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* **445**, 771–775 (2007).
115. L. M. Williams, A. Y. Rudensky, Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat. Immunol.* **8**, 277–284 (2007).

116. D. Schmidt, *et al.*, The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* **131**, 933–942 (2004).
117. N. H. Uhlénhaut, *et al.*, Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation. *Cell* **139**, 1130–1142 (2009).
118. A. Georges, *et al.*, The transcription factor FOXL2 mobilizes estrogen signaling to maintain the identity of ovarian granulosa cells. *eLife* **3**, e04207 (2014).
119. M. L. Golson, *et al.*, Activation of FoxM1 Revitalizes the Replicative Potential of Aged β -Cells in Male Mice and Enhances Insulin Secretion. *Diabetes* **64**, 3829–3838 (2015).
120. B. N, *et al.*, Transplanted Hepatocytes Over-Expressing FoxM1B Efficiently Repopulate Chronically Injured Mouse Liver Independent of Donor Age. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **15** (2007) Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17565348/?from_term=Brezillon&from_filter=years.2007-2007&from_pos=5 [Accessed June 11, 2020].
121. A. E. Webb, A. Brunet, FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 159–169 (2014).
122. I. Shimokawa, *et al.*, The life-extending effect of dietary restriction requires Foxo3 in mice. *Aging Cell* **14**, 707–709 (2015).
123. K. M. Roupé, *et al.*, Transcription factor binding site analysis identifies FOXO transcription factors as regulators of the cutaneous wound healing process. *PLoS ONE* **9**, e89274 (2014).
124. V. L. Martins, M. Caley, E. A. O’Toole, Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell Tissue Res.* **351**, 255–268 (2013).
125. B. Ponugoti, *et al.*, FOXO1 promotes wound healing through the up-regulation of TGF- β 1 and prevention of oxidative stress. *J. Cell Biol.* **203**, 327–343 (2013).
126. J. D. Fontenot, M. A. Gavin, A. Y. Rudensky, Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 330–336 (2003).
127. M. Miyara, *et al.*, Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* **30**, 899–911 (2009).
128. M. Nehls, D. Pfeifer, M. Schorpp, H. Hedrich, T. Boehm, New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature* **372**, 103–107 (1994).
129. L. Lin, J. D. Hron, S. L. Peng, Regulation of NF- κ B, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a. *Immunity* **21**, 203–213 (2004).
130. S. Lee, H. H. Dong, FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism. *J. Endocrinol.* **233**, R67–R79 (2017).
131. G. Tzivion, M. Dobson, G. Ramakrishnan, FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1938–1945 (2011).
132. R. Behr, *et al.*, Mild nephrogenic diabetes insipidus caused by Foxa1 deficiency. *J. Biol. Chem.* **279**, 41936–41941 (2004).

133. J. P. Silva, *et al.*, Regulation of adaptive behaviour during fasting by hypothalamic Foxa2. *Nature* **462**, 646–650 (2009).
134. D. Hanahan, R. A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
135. D. Hanahan, R. A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
136. G. Zhang, *et al.*, FOXA1 defines cancer cell specificity. *Sci Adv* **2**, e1501473 (2016).
137. L. Lin, *et al.*, The hepatocyte nuclear factor 3 alpha gene, HNF3alpha (FOXA1), on chromosome band 14q13 is amplified and overexpressed in esophageal and lung adenocarcinomas. *Cancer Res.* **62**, 5273–5279 (2002).
138. D. J. DeGraff, *et al.*, Loss of the Urothelial Differentiation Marker FOXA1 Is Associated with High Grade, Late Stage Bladder Cancer and Increased Tumor Proliferation. *PLoS One* **7** (2012).
139. B. Sahu, *et al.*, Dual role of FoxA1 in androgen receptor binding to chromatin, androgen signalling and prostate cancer. *EMBO J.* **30**, 3962–3976 (2011).
140. S. Jäggle, *et al.*, SNAIL1-mediated downregulation of FOXA proteins facilitates the inactivation of transcriptional enhancer elements at key epithelial genes in colorectal cancer cells. *PLoS Genet* **13** (2017).
141. M. Fournier, *et al.*, FOXA and master transcription factors recruit Mediator and Cohesin to the core transcriptional regulatory circuitry of cancer cells. *Sci Rep* **6**, 1–11 (2016).
142. C. Wolfrum, E. Asilmaz, E. Luca, J. M. Friedman, M. Stoffel, Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature* **432**, 1027–1032 (2004).
143. R. P. Arun, D. Sivanesan, P. Vidyasekar, R. S. Verma, PTEN/FOXO3/AKT pathway regulates cell death and mediates morphogenetic differentiation of Colorectal Cancer Cells under Simulated Microgravity. *Sci Rep* **7** (2017).
144. A. Brunet, *et al.*, Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857–868 (1999).
145. R. J. Shaw, L. C. Cantley, Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **441**, 424–430 (2006).
146. M. G. Kharas, *et al.*, Phosphoinositide 3-kinase signaling is essential for ABL oncogene-mediated transformation of B-lineage cells. *Blood* **103**, 4268–4275 (2004).
147. B. Scheijen, H. T. Ngo, H. Kang, J. D. Griffin, FLT3 receptors with internal tandem duplications promote cell viability and proliferation by signaling through Foxo proteins. *Oncogene* **23**, 3338–3349 (2004).
148. W. Yang, N. G. Dolloff, W. S. El-Deiry, ERK and MDM2 prey on FOXO3a. *Nat. Cell Biol.* **10**, 125–126 (2008).
149. J. Sunayama, *et al.*, FoxO3a functions as a key integrator of cellular signals that control glioblastoma stem-like cell differentiation and tumorigenicity. *Stem Cells* **29**, 1327–1337 (2011).

150. M. C.-T. Hu, *et al.*, I κ B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* **117**, 225–237 (2004).
151. N. Chapuis, *et al.*, I κ B kinase overcomes PI3K/Akt and ERK/MAPK to control FOXO3a activity in acute myeloid leukemia. *Blood* **116**, 4240–4250 (2010).
152. J.-P. Guo, *et al.*, I κ BKE phosphorylation and inhibition of FOXO3a: a mechanism of I κ BKE oncogenic function. *PLoS ONE* **8**, e63636 (2013).
153. Y. C. Lin, *et al.*, A global network of transcription factors, involving E2A, EBF1 and Foxo1, that orchestrates B cell fate. *Nat. Immunol.* **11**, 635–643 (2010).
154. Y. Guo, H. Liu, H. Zhang, C. Shang, Y. Song, miR-96 regulates FOXO1-mediated cell apoptosis in bladder cancer. *Oncol Lett* **4**, 561–565 (2012).
155. M. F. Segura, *et al.*, Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 1814–1819 (2009).
156. I. K. Guttilla, B. A. White, Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 23204–23216 (2009).
157. L. Xie, *et al.*, FOXO1 is a tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **119**, 3503–3511 (2012).
158. S. S. Myatt, *et al.*, Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer. *Cancer Res.* **70**, 367–377 (2010).
159. Z. Wu, H. Sun, W. Zeng, J. He, X. Mao, Upregulation of MicroRNA-370 induces proliferation in human prostate cancer cells by downregulating the transcription factor FOXO1. *PLoS ONE* **7**, e45825 (2012).
160. F. Pellicano, *et al.*, The antiproliferative activity of kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia cells is mediated by FOXO transcription factors. *Stem Cells* **32**, 2324–2337 (2014).
161. K. Naka, *et al.*, TGF-beta-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* **463**, 676–680 (2010).
162. C. Hurtz, *et al.*, BCL6-mediated repression of p53 is critical for leukemia stem cell survival in chronic myeloid leukemia. *J. Exp. Med.* **208**, 2163–2174 (2011).
163. S. M. Sykes, *et al.*, AKT/FOXO signaling enforces reversible differentiation blockade in myeloid leukemias. *Cell* **146**, 697–708 (2011).
164. V. V. Prabhu, J. E. Allen, D. T. Dicker, W. S. El-Deiry, Small-Molecule ONC201/TIC10 Targets Chemotherapy-Resistant Colorectal Cancer Stem-like Cells in an Akt/Foxo3a/TRAIL-Dependent Manner. *Cancer Res.* **75**, 1423–1432 (2015).
165. N. Kikuno, *et al.*, Knockdown of astrocyte-elevated gene-1 inhibits prostate cancer progression through upregulation of FOXO3a activity. *Oncogene* **26**, 7647–7655 (2007).
166. M. Shiota, *et al.*, Foxo3a suppression of urothelial cancer invasiveness through Twist1, Y-box-binding protein 1, and E-cadherin regulation. *Clin. Cancer Res.* **16**, 5654–5663 (2010).

167. B. Su, *et al.*, A Genome-Wide RNAi Screen Identifies FOXO4 as a Metastasis-Suppressor through Counteracting PI3K/AKT Signal Pathway in Prostate Cancer. *PLoS One* **9** (2014).
168. H. Zhang, *et al.*, FOXO1 inhibits Runx2 transcriptional activity and prostate cancer cell migration and invasion. *Cancer Res.* **71**, 3257–3267 (2011).
169. S. P. Tenbaum, *et al.*, 687 Beta-catenin Confers Resistance to PI3K and AKT Inhibitors and Subverts FOXO3a to Promote Metastasis in Colon Cancer. *European Journal of Cancer* **48**, S162 (2012).
170. O. Arqués, *et al.*, Tankyrase Inhibition Blocks Wnt/ β -Catenin Pathway and Reverts Resistance to PI3K and AKT Inhibitors in the Treatment of Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* **22**, 644–656 (2016).
171. P. Storz, H. Döppler, J. A. Copland, K. J. Simpson, A. Toker, FOXO3a promotes tumor cell invasion through the induction of matrix metalloproteinases. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4906–4917 (2009).
172. X. Feng, *et al.*, Cdc25A regulates matrix metalloprotease 1 through Foxo1 and mediates metastasis of breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 3457–3471 (2011).
173. S. Courtois-Cox, *et al.*, A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* **10**, 459–472 (2006).
174. P. L. J. de Keizer, *et al.*, Activation of forkhead box O transcription factors by oncogenic BRAF promotes p21cip1-dependent senescence. *Cancer Res.* **70**, 8526–8536 (2010).
175. S. Y. Yoo, S. M. Kwon, Angiogenesis and Its Therapeutic Opportunities. *Mediators of Inflammation* **2013**, 1–11 (2013).
176. T. Furuyama, *et al.*, Abnormal angiogenesis in Foxo1 (Fkhr)-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **279**, 34741–34749 (2004).
177. M. R. Abid, *et al.*, A novel class of vascular endothelial growth factor-responsive genes that require forkhead activity for expression. *J. Biol. Chem.* **281**, 35544–35553 (2006).
178. S. Y. Kim, *et al.*, Constitutive phosphorylation of the FOXO1 transcription factor in gastric cancer cells correlates with microvessel area and the expressions of angiogenesis-related molecules. *BMC Cancer* **11**, 264 (2011).
179. S. Yalcin, *et al.*, ROS-mediated amplification of AKT/mTOR signalling pathway leads to myeloproliferative syndrome in Foxo3(-/-) mice. *EMBO J.* **29**, 4118–4131 (2010).
180. Y. Zhao, *et al.*, Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity. *Nat. Cell Biol.* **12**, 665–675 (2010).
181. J. Laoukili, M. Stahl, R. H. Medema, FoxM1: at the crossroads of ageing and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1775**, 92–102 (2007).
182. J. Laoukili, *et al.*, FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nat. Cell Biol.* **7**, 126–136 (2005).

183. J.-M. Wang, *et al.*, MiR-214 inhibits cell migration, invasion and promotes the drug sensitivity in human cervical cancer by targeting FOXM1. *Am J Transl Res* **9**, 3541–3557 (2017).
184. R. Molinuevo, *et al.*, FOXM1 allows human keratinocytes to bypass the oncogene-induced differentiation checkpoint in response to gain of MYC or loss of p53. *Oncogene* **36**, 956–965 (2017).
185. Y. Yoshida, I.-C. Wang, H. M. Yoder, N. O. Davidson, R. H. Costa, The forkhead box M1 transcription factor contributes to the development and growth of mouse colorectal cancer. *Gastroenterology* **132**, 1420–1431 (2007).
186. M. M. Matzuk, D. J. Lamb, The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat. Med.* **14**, 1197–1213 (2008).
187. M. A. Edson, A. K. Nagaraja, M. M. Matzuk, The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr. Rev.* **30**, 624–712 (2009).
188. X. Luo, Y. Ikeda, K. L. Parker, A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* **77**, 481–490 (1994).
189. A. Biason-Lauber, Control of sex development. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **24**, 163–186 (2010).
190. A. Bashamboo, *et al.*, Human male infertility associated with mutations in NR5A1 encoding steroidogenic factor 1. *Am. J. Hum. Genet.* **87**, 505–512 (2010).
191. M.-C. Chaboissier, *et al.*, Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* **131**, 1891–1901 (2004).
192. F. Barrionuevo, *et al.*, Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biol. Reprod.* **74**, 195–201 (2006).
193. H. H.-C. Yao, W. Whoriskey, B. Capel, Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev.* **16**, 1433–1440 (2002).
194. H. H. C. Yao, *et al.*, Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev. Dyn.* **230**, 210–215 (2004).
195. M. Uda, *et al.*, Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1171–1181 (2004).
196. P. Bernard, H. Sim, K. Knowler, E. Vilain, V. Harley, Human SRY inhibits beta-catenin-mediated transcription. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 2889–2900 (2008).
197. S. Dupont, *et al.*, Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* **127**, 4277–4291 (2000).
198. C. R. Fisher, K. H. Graves, A. F. Parlow, E. R. Simpson, Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 6965–6970 (1998).

199. D. Tomic, *et al.*, Ovarian Follicle Development Requires Smad3. *Mol Endocrinol* **18**, 2224–2240 (2004).
200. R. R. Behringer, R. L. Cate, G. J. Froelick, R. D. Palmiter, R. L. Brinster, Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing müllerian inhibiting substance. *Nature* **345**, 167–170 (1990).
201. A. Paredes, *et al.*, Loss of synaptonemal complex protein-1, a synaptonemal complex protein, contributes to the initiation of follicular assembly in the developing rat ovary. *Endocrinology* **146**, 5267–5277 (2005).
202. M. E. Pepling, A. C. Spradling, Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev. Biol.* **234**, 339–351 (2001).
203. S. M. Soyal, A. Amleh, J. Dean, FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* **127**, 4645–4654 (2000).
204. D. J. Trombly, T. K. Woodruff, K. E. Mayo, Suppression of Notch signaling in the neonatal mouse ovary decreases primordial follicle formation. *Endocrinology* **150**, 1014–1024 (2009).
205. E. Nilsson, B. Zhang, M. K. Skinner, Gene bionetworks that regulate ovarian primordial follicle assembly. *BMC Genomics* **14**, 496 (2013).
206. P. A. Fowler, *et al.*, Gene expression analysis of human fetal ovarian primordial follicle formation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 1427–1435 (2009).
207. A. Gougeon, Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. *Ann. Endocrinol. (Paris)* **71**, 132–143 (2010).
208. K. H. Albrecht, E. M. Eicher, Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev. Biol.* **240**, 92–107 (2001).
209. S. J. Palmer, P. S. Burgoyne, In situ analysis of fetal, prepuberal and adult XX----XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development* **112**, 265–268 (1991).
210. S. J. Palmer, P. S. Burgoyne, The *Mus musculus domesticus* Tdy allele acts later than the *Mus musculus musculus* Tdy allele: a basis for XY sex-reversal in C57BL/6-YPOS mice. *Development* **113**, 709–714 (1991).
211. L. Mork, *et al.*, Temporal differences in granulosa cell specification in the ovary reflect distinct follicle fates in mice. *Biol. Reprod.* **86**, 37 (2012).
212. A. N. Hirshfield, Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biol. Reprod.* **44**, 1157–1162 (1991).
213. G. Fink, Oestrogen and progesterone interactions in the control of gonadotrophin and prolactin secretion. *J. Steroid Biochem.* **30**, 169–178 (1988).
214. R. Hampl, M. Šnajderová, T. Mardešić, Antimüllerian hormone (AMH) not only a marker for prediction of ovarian reserve. *Physiol Res* **60**, 217–223 (2011).

215. D. Liu, *et al.*, Alterations in gene expression during sexual differentiation in androgen receptor knockout mice induced by environmental endocrine disruptors. *Int. J. Mol. Med.* **35**, 399–404 (2015).
216. J. Dong, *et al.*, Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* **383**, 531–535 (1996).
217. N. H. Uhlenhaut, M. Treier, Forkhead transcription factors in ovarian function. *Reproduction* **142**, 489–495 (2011).
218. J. S. Richards, S. C. Sharma, A. E. Falender, Y. H. Lo, Expression of FKHR, FKHL1, and AFX Genes in the Rodent Ovary: Evidence for Regulation by IGF-I, Estrogen, and the Gonadotropins. *Mol Endocrinol* **16**, 580–599 (2002).
219. F. Shi, P. S. LaPolt, Relationship between FoxO1 protein levels and follicular development, atresia, and luteinization in the rat ovary. *J. Endocrinol.* **179**, 195–203 (2003).
220. M. D. Pisarska, *et al.*, Expression of forkhead transcription factors in human granulosa cells. *Fertility and Sterility* **91**, 1392–1394 (2009).
221. D. Accili, K. C. Arden, FoxOs at the Crossroads of Cellular Metabolism, Differentiation, and Transformation. *Cell* **117**, 421–426 (2004).
222. K. H. Burns, G. E. Owens, S. C. Ogbonna, J. H. Nilson, M. M. Matzuk, Expression Profiling Analyses of Gonadotropin Responses and Tumor Development in the Absence of Inhibins. *Endocrinology* **144**, 4492–4507 (2003).
223. G. F. Erickson, S. Shimasaki, The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 20 (2003).
224. Y. Park, *et al.*, Induction of cyclin D2 in rat granulosa cells requires FSH-dependent relief from FOXO1 repression coupled with positive signals from Smad. *J. Biol. Chem.* **280**, 9135–9148 (2005).
225. Z. Liu, *et al.*, FSH and FOXO1 Regulate Genes in the Sterol/Steroid and Lipid Biosynthetic Pathways in Granulosa Cells. *Mol Endocrinol* **23**, 649–661 (2009).
226. D. H. Castrillon, L. Miao, R. Kollipara, J. W. Horner, R. A. DePinho, Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* **301**, 215–218 (2003).
227. T. Hosaka, *et al.*, Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 2975–2980 (2004).
228. G. B. John, T. D. Gallardo, L. J. Shirley, D. H. Castrillon, Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Dev. Biol.* **321**, 197–204 (2008).
229. Z. Liu, D. H. Castrillon, W. Zhou, J. S. Richards, FOXO1/3 depletion in granulosa cells alters follicle growth, death and regulation of pituitary FSH. *Mol. Endocrinol.* **27**, 238–252 (2013).
230. J.-H. Paik, *et al.*, FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell* **128**, 309–323 (2007).

231. J.-H. An, *et al.*, The expression of p21 is upregulated by forkhead box A1/2 in p53-null H1299 cells. *FEBS Lett.* **588**, 4065–4070 (2014).
232. A. Li, J. Wang, M. Wu, X. Zhang, H. Zhang, The inhibition of activated hepatic stellate cells proliferation by arctigenin through G0/G1 phase cell cycle arrest: persistent p27(Kip1) induction by interfering with PI3K/Akt/FOXO3a signaling pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **747**, 71–87 (2015).
233. D. Germain, Sirtuins and the Estrogen Receptor as Regulators of the Mammalian Mitochondrial UPR in Cancer and Aging. *Adv. Cancer Res.* **130**, 211–256 (2016).
234. D. Mattiske, P. Sommer, S. H. Kidson, B. L. M. Hogan, The role of the forkhead transcription factor, Foxc1, in the development of the mouse lacrimal gland. *Dev. Dyn.* **235**, 1074–1080 (2006).
235. P. May-Panloup, *et al.*, Molecular characterization of corona radiata cells from patients with diminished ovarian reserve using microarray and microfluidic-based gene expression profiling. *Hum. Reprod.* **27**, 829–843 (2012).
236. J. Ferlay, *et al.*, Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur. J. Cancer* **103**, 356–387 (2018).
237. A.-M. Noone, *et al.*, Cancer Incidence and Survival Trends by Subtype Using Data from the Surveillance Epidemiology and End Results Program, 1992-2013. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **26**, 632–641 (2017).
238. V. W. Chen, *et al.*, Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer* **97**, 2631–2642 (2003).
239. D. M. Gershenson, Update on malignant ovarian germ cell tumors. *Cancer* **71**, 1581–1590 (1993).
240. R. J. Kurman, U. Goebelsmann, C. R. Taylor, Steroid localization in granulosa-theca tumors of the ovary. *Cancer* **43**, 2377–2384 (1979).
241. L. Bessièrre, *et al.*, A Hot-spot of In-frame Duplications Activates the Oncoprotein AKT1 in Juvenile Granulosa Cell Tumors. *EBioMedicine* **2**, 421–431 (2015).
242. A. Auguste, *et al.*, Molecular analyses of juvenile granulosa cell tumors bearing AKT1 mutations provide insights into tumor biology and therapeutic leads. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 6687–6698 (2015).
243. B. Liu, S.-M. Han, X.-Y. Tang, L. Han, C.-Z. Li, Overexpressed FOXC2 in ovarian cancer enhances the epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of ovarian cancer cells. *Oncol. Rep.* **31**, 2545–2554 (2014).
244. B. G. Hollier, *et al.*, FOXC2 expression links epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in breast cancer. *Cancer Res.* **73**, 1981–1992 (2013).
245. N. Nishida, *et al.*, FOXC2 is a novel prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* **18**, 535–542 (2011).
246. V. Besnard, S. E. Wert, W. M. Hull, J. A. Whitsett, Immunohistochemical localization of Foxa1 and Foxa2 in mouse embryos and adult tissues. *Gene Expr. Patterns* **5**, 193–208 (2004).

247. Y. A. Yang, J. Yu, Current perspectives on FOXA1 regulation of androgen receptor signaling and prostate cancer. *Genes Dis* **2**, 144–151 (2015).
248. G. M. Bernardo, R. A. Keri, FOXA1: a transcription factor with parallel functions in development and cancer. *Biosci. Rep.* **32**, 113–130 (2012).
249. L.-L. Wang, *et al.*, The transcription factor FOXA1 induces epithelial ovarian cancer tumorigenesis and progression: *Tumor Biology* (2017) <https://doi.org/10.1177/1010428317706210> (July 6, 2020).
250. C. Li, *et al.*, Forkhead Box Protein C2 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition, Migration and Invasion in Cisplatin-Resistant Human Ovarian Cancer Cell Line (SKOV3/CDDP). *Cell. Physiol. Biochem.* **39**, 1098–1110 (2016).
251. R. A. Tassi, *et al.*, FOXM1 expression is significantly associated with chemotherapy resistance and adverse prognosis in non-serous epithelial ovarian cancer patients. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **36**, 63 (2017).
252. B. A. Benayoun, *et al.*, The identification and characterization of a FOXL2 response element provides insights into the pathogenesis of mutant alleles. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3118–3127 (2008).
253. J. Cocquet, *et al.*, Evolution and expression of FOXL2. *J Med Genet* **39**, 916–921 (2002).
254. L. Crisponi, *et al.*, The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat. Genet.* **27**, 159–166 (2001).
255. D. Beysen, *et al.*, Missense mutations in the forkhead domain of FOXL2 lead to subcellular mislocalization, protein aggregation and impaired transactivation. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 2030–2038 (2008).
256. L. Moumné, *et al.*, The mutations and potential targets of the forkhead transcription factor FOXL2. *Mol. Cell. Endocrinol.* **282**, 2–11 (2008).
257. A. Georges, *et al.*, SUMOylation of the Forkhead Transcription Factor FOXL2 Promotes Its Stabilization/Activation through Transient Recruitment to PML Bodies. *PLoS One* **6** (2011).
258. B. A. Benayoun, R. A. Veitia, A post-translational modification code for transcription factors: sorting through a sea of signals. *Trends Cell Biol.* **19**, 189–197 (2009).
259. H. Dollfus, *et al.*, Sporadic and familial blepharophimosis -ptosis-epicanthus inversus syndrome: FOXL2 mutation screen and MRI study of the superior levator eyelid muscle. *Clin. Genet.* **63**, 117–120 (2003).
260. D. J. Bunyan, N. S. Thomas, Screening of a large cohort of blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome patients reveals a very strong paternal inheritance bias and a wide spectrum of novel FOXL2 mutations. *Eur J Med Genet* **62**, 103668 (2019).
261. M. Treier, *et al.*, Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev.* **12**, 1691–1704 (1998).
262. B. S. Ellsworth, *et al.*, FOXL2 in the pituitary: molecular, genetic, and developmental analysis. *Mol. Endocrinol.* **20**, 2796–2805 (2006).

263. D. Baron, *et al.*, Foxl2 gene and the development of the ovary: a story about goat, mouse, fish and woman. *Reprod. Nutr. Dev.* **45**, 377–382 (2005).
264. M. S. Govoroun, *et al.*, Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Dev. Dyn.* **231**, 859–870 (2004).
265. K. A. Loffler, D. Zarkower, P. Koopman, Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: FOXL2 is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinology* **144**, 3237–3243 (2003).
266. M. D. Pisarska, F.-T. Kuo, I. K. Bentsi-Barnes, S. Khan, G. M. Barlow, LATS1 phosphorylates forkhead L2 and regulates its transcriptional activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**, E101–E109 (2010).
267. A. M. Liu, K.-F. Wong, X. Jiang, Y. Qiao, J. M. Luk, Regulators of mammalian Hippo pathway in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1826**, 357–364 (2012).
268. M. A. St John, *et al.*, Mice deficient of Lats1 develop soft-tissue sarcomas, ovarian tumours and pituitary dysfunction. *Nat. Genet.* **21**, 182–186 (1999).
269. V. G. Wilson, “Introduction to Sumoylation” in *SUMO Regulation of Cellular Processes*, Advances in Experimental Medicine and Biology., V. G. Wilson, Ed. (Springer International Publishing, 2017), pp. 1–12.
270. M. Marongiu, *et al.*, Novel action of FOXL2 as mediator of Col1a2 gene autoregulation. *Developmental Biology* **416**, 200–211 (2016).
271. G. Méduri, *et al.*, FOXL2 mutations lead to different ovarian phenotypes in BPES patients: Case Report. *Hum. Reprod.* **25**, 235–243 (2010).
272. E. Pailhoux, *et al.*, A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nat. Genet.* **29**, 453–458 (2001).
273. D. M. Maatouk, L. Mork, A.-A. Chassot, M.-C. Chaboissier, B. Capel, Disruption of mitotic arrest precedes precocious differentiation and transdifferentiation of pregranulosa cells in the perinatal Wnt4 mutant ovary. *Dev. Biol.* **383**, 295–306 (2013).
274. P. Lamba, J. Fortin, S. Tran, Y. Wang, D. J. Bernard, A Novel Role for the Forkhead Transcription Factor FOXL2 in Activin A-Regulated Follicle-Stimulating Hormone β Subunit Transcription. *Mol Endocrinol* **23**, 1001–1013 (2009).
275. B. S. Ellsworth, *et al.*, The gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor activating sequence (GRAS) is a composite regulatory element that interacts with multiple classes of transcription factors including Smads, AP-1 and a forkhead DNA binding protein. *Molecular and Cellular Endocrinology* **206**, 93–111 (2003).
276. A. L. Blount, *et al.*, FoxL2 and Smad3 Coordinately Regulate Follistatin Gene Transcription. *J. Biol. Chem.* **284**, 7631–7645 (2009).
277. S. Tran, P. Lamba, Y. Wang, D. J. Bernard, SMADs and FOXL2 Synergistically Regulate Murine FSH β Transcription Via a Conserved Proximal Promoter Element. *Molecular Endocrinology* **25**, 1170–1183 (2011).

278. M. Anttonen, *et al.*, FOXL2, GATA4, and SMAD3 Co-Operatively Modulate Gene Expression, Cell Viability and Apoptosis in Ovarian Granulosa Cell Tumor Cells. *PLoS One* **9** (2014).
279. D. L'Hôte, *et al.*, Discovery of novel protein partners of the transcription factor FOXL2 provides insights into its physiopathological roles. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 3264–3274 (2012).
280. S. Kavuri, R. Kulkarni, M. Reid-Nicholson, Granulosa cell tumor of the ovary: cytologic findings. *Acta Cytol.* **54**, 551–559 (2010).
281. A. Amsterdam, N. Selvaraj, Control of differentiation, transformation, and apoptosis in granulosa cells by oncogenes, oncoviruses, and tumor suppressor genes. *Endocr. Rev.* **18**, 435–461 (1997).
282. E. S. Newlands, *et al.*, Treatment of patients with poor prognosis anaplastic germ cell tumours (AGCT) of the testis and other sites. *Int. J. Androl.* **10**, 301–309 (1987).
283. S. P. Shah, *et al.*, Mutation of FOXL2 in Granulosa-Cell Tumors of the Ovary. *New England Journal of Medicine* **360**, 2719–2729 (2009).
284. S. Jamieson, *et al.*, The FOXL2 C134W mutation is characteristic of adult granulosa cell tumors of the ovary. *Mod. Pathol.* **23**, 1477–1485 (2010).
285. J.-H. KIM, J. BAE, Differential Apoptotic and Proliferative Activities of Wild-type FOXL2 and Blepharophimosis-ptosis-epicanthus Inversus Syndrome (BPES)-associated Mutant FOXL2 Proteins. *J Reprod Dev* **60**, 14–20 (2014).
286. K. A. Schrader, *et al.*, The specificity of the FOXL2 c.402C>G somatic mutation: a survey of solid tumors. *PLoS ONE* **4**, e7988 (2009).
287. E. D'Angelo, *et al.*, Prognostic significance of FOXL2 mutation and mRNA expression in adult and juvenile granulosa cell tumors of the ovary. *Mod. Pathol.* **24**, 1360–1367 (2011).
288. S. Caburet, *et al.*, Combined comparative genomic hybridization and transcriptomic analyses of ovarian granulosa cell tumors point to novel candidate driver genes. *BMC Cancer* **15**, 251 (2015).
289. R. T. Hillman, *et al.*, KMT2D/MLL2 inactivation is associated with recurrence in adult-type granulosa cell tumors of the ovary. *Nat Commun* **9**, 2496 (2018).
290. M. Alexiadis, *et al.*, Mutational Landscape of Ovarian Adult Granulosa Cell Tumors from Whole Exome and Targeted TERT Promoter Sequencing. *Mol. Cancer Res.* **17**, 177–185 (2019).
291. Y. K. Wang, *et al.*, Genomic consequences of aberrant DNA repair mechanisms stratify ovarian cancer histotypes. *Nat. Genet.* **49**, 856–865 (2017).
292. R. J, *et al.*, Whole Genome Analysis of Ovarian Granulosa Cell Tumors Reveals Tumor Heterogeneity and a High-Grade TP53-Specific Subgroup. *Cancers* **12** (2020) Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32455687/> [Accessed July 8, 2020].
293. J. F. Couse, *et al.*, Postnatal Sex Reversal of the Ovaries in Mice Lacking Estrogen Receptors α and β . *Science* **286**, 2328–2331 (1999).

294. B. D. Looyenga, G. D. Hammer, Genetic Removal of Smad3 from Inhibin-Null Mice Attenuates Tumor Progression by Uncoupling Extracellular Mitogenic Signals from the Cell Cycle Machinery. *Mol Endocrinol* **21**, 2440–2457 (2007).
295. B. S. Middlebrook, K. Eldin, X. Li, S. Shivasankaran, S. A. Pangas, Smad1-Smad5 Ovarian Conditional Knockout Mice Develop a Disease Profile Similar to the Juvenile Form of Human Granulosa Cell Tumors. *Endocrinology* **150**, 5208–5217 (2009).
296. S. A. Pangas, *et al.*, Conditional Deletion of Smad1 and Smad5 in Somatic Cells of Male and Female Gonads Leads to Metastatic Tumor Development in Mice. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 248–257 (2008).
297. M. Bilandzic, *et al.*, Betaglycan Alters NF κ B-TGF β 2 Cross Talk to Reduce Survival of Human Granulosa Tumor Cells. *Mol Endocrinol* **27**, 466–479 (2013).
298. M. Rahmoun, *et al.*, In mammalian foetal testes, SOX9 regulates expression of its target genes by binding to genomic regions with conserved signatures. *Nucleic Acids Res.* **45**, 7191–7211 (2017).
299. C.-T. Cheng, C.-Y. Kuo, D. K. Ann, KAP1 in charge of multiple missions: Emerging roles of KAP1. *World J Biol Chem* **5**, 308–320 (2014).
300. R. P. McNamara, *et al.*, KAP1 Recruitment of the 7SK snRNP Complex to Promoters Enables Transcription Elongation by RNA Polymerase II. *Molecular Cell* **61**, 39–53 (2016).
301. A. R. Kornblihtt, *et al.*, Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14**, 153–165 (2013).
302. X. Rambout, F. Dequiedt, L. E. Maquat, Beyond Transcription: Roles of Transcription Factors in Pre-mRNA Splicing. *Chem. Rev.* **118**, 4339–4364 (2018).
303. S. Oltean, D. O. Bates, Hallmarks of alternative splicing in cancer. *Oncogene* **33**, 5311–5318 (2014).
304. Y. Nishi, *et al.*, Establishment and Characterization of a Steroidogenic Human Granulosa-Like Tumor Cell Line, KGN, That Expresses Functional Follicle-Stimulating Hormone Receptor. *Endocrinology* **142**, 437–445 (2001).
305. H. Zhang, *et al.*, Characterization of an immortalized human granulosa cell line (COV434). *Mol Hum Reprod* **6**, 146–153 (2000).
306. F. Wang, *et al.*, Defective insulin signaling and the protective effects of dimethyldiguanide during follicular development in the ovaries of polycystic ovary syndrome. *Mol Med Rep* **16**, 8164–8170 (2017).
307. M. Belani, *et al.*, Differential insulin and steroidogenic signaling in insulin resistant and non-insulin resistant human luteinized granulosa cells—A study in PCOS patients. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **178**, 283–292 (2018).
308. A. S. K. Jones, A. Shikanov, Follicle development as an orchestrated signaling network in a 3D organoid. *J Biol Eng* **13** (2019).

309. J.-H. Kim, *et al.*, FOXL2 posttranslational modifications mediated by GSK3 β determine the growth of granulosa cell tumours. *Nature Communications* **5**, 2936 (2014).
310. M. Belli, C. Secchi, D. Stupack, S. Shimasaki, FOXO1 Negates the Cooperative Action of FOXL2C134W and SMAD3 in CYP19 Expression in HGrC1 Cells by Sequestering SMAD3. *Journal of the Endocrine Society* **3**, 2064–2081 (2019).

Annexe

En annexe se trouve un dernier travail que j'ai réalisé en collaboration avec Maëva El-Zaiat, post-doctorante dans l'équipe, et qui a donné lieu à une publication ([article 3](#)). Il s'agit d'un article de recherche dans lequel nous avons étudié le rôle moléculaire d'AKT1 dans les cellules de la granulosa. Afin de mieux comprendre sa fonction dans ces cellules, nous avons réalisé le KD *Akt* dans les cellules primaires de granulosa murines (similairement au protocole décrit dans l'[article 1](#)) et évalué les conséquences moléculaires au niveau du transcrit et des protéines. Nous avons pu corroborer l'implication d'AKT1 dans la régulation du métabolisme, de l'apoptose, du cycle cellulaire ou de la dynamique du cytosquelette dans ce type de cellules ovariennes. De manière cohérente, nous avons montré dans des GC établies que le KD d'*Akt1* provoquait une migration persistante directionnelle altérée et augmentait leur vitesse. Cette étude nous a également permis de mettre en avant de nouvelles cibles directes et indirectes de la kinase. En effet, une série de protéines impliquées dans le transport intracellulaire et la physiologie mitochondriale ont été significativement affectées par la déplétion d'*Akt1*. *Via* des analyses *in silico*, nous proposons un ensemble de kinases et de facteurs de transcription qui peuvent servir de médiateurs à l'action d'AKT1 sur les transcrits et les protéines dérégulées. Dans l'ensemble, nos résultats fournissent une ressource de cibles directes et indirectes d'AKT1 dans les GC et peuvent aider à comprendre son rôle dans ce type de cellules ovariennes.

Cet article offre un aperçu supplémentaire des mécanismes mis en jeu dans les cellules de la granulosa.

High-throughput Exploration of the Network Dependent on AKT1 in Mouse Ovarian Granulosa Cells

Authors

Maëva Elzaiat, Laetitia Herman, Bérange Legois, Thibaut Léger, Anne-Laure Todeschini, and Reiner A. Veitia

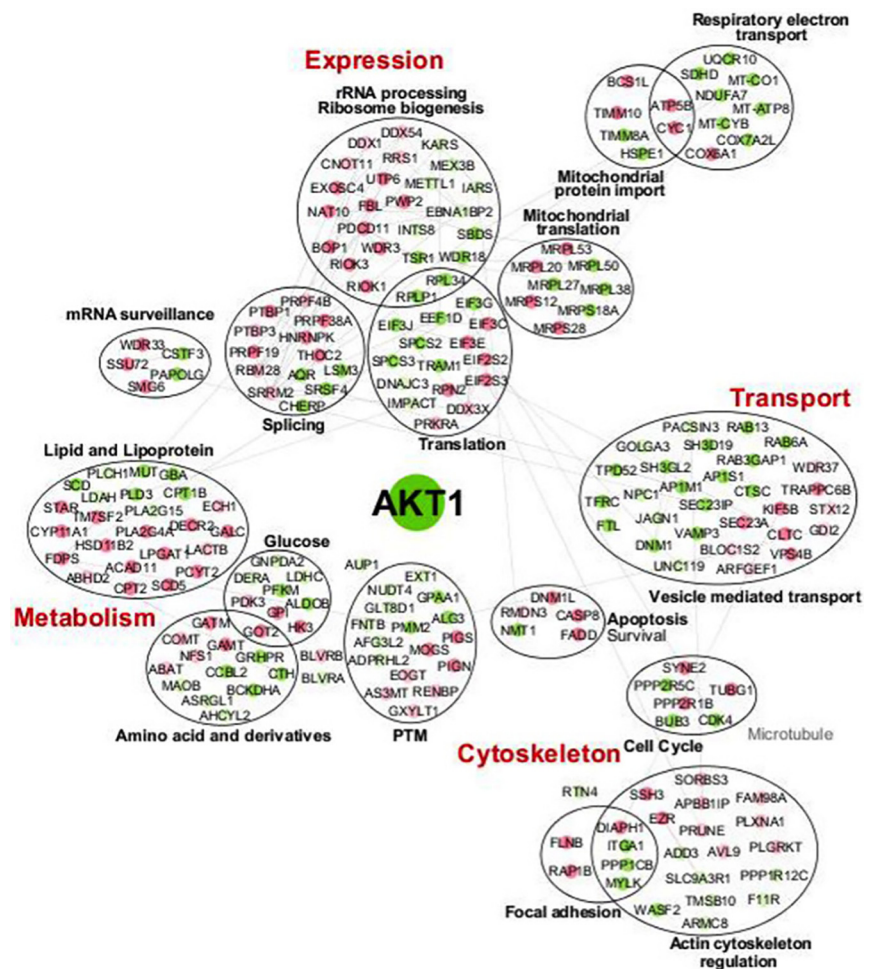
Correspondence

reiner.veitia@ijm.fr,
anne-laure.todeschini@ijm.fr

In Brief

The PI3K/AKT signaling pathway is known to regulate a broad range of cellular processes, and it is often altered in cancer. We have performed high-throughput analyses of the proteins and transcripts deregulated after *Akt1* depletion in primary murine granulosa cells, which are the supporting cells of the oocyte. We found known and novel cellular processes perturbed by *AKT1* knock-down. Our results confirm and extend the role of this kinase in critical cellular processes, such as directional migration, and provide a series of new substrate candidates that deserve further investigation.

Graphical Abstract



Network dependent on AKT1 in murine granulosa cells

Highlights

- Proteome and transcriptome analysis after *Akt1* KD in mouse primary granulosa cells.
- A resource of known and novel biological processes regulated by *AKT1*.
- A resource of putative kinases and transcription factors acting downstream of *AKT1*.
- Altered velocity and directional migration in granulosa cells depleted for *Akt1*.

Elzaiat et al., 2019, *Molecular & Cellular Proteomics* 18, 2–14

July 2019 © 2019 Elzaiat et al. Published under exclusive license by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

<https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001461>



High-throughput Exploration of the Network Dependent on AKT1 in Mouse Ovarian Granulosa Cells*

Maëva Elzaïat‡§, Laetitia Herman‡§, Bérangère Legois‡§, Thibaut Léger‡, Anne-Laure Todeschini‡§||, and Reiner A. Veitia‡§||

The PI3K/AKT signaling pathway is known to regulate a broad range of cellular processes, and it is often altered in several types of cancers. Recently, somatic *AKT1* mutations leading to a strong activation of this kinase have been reported in juvenile granulosa cell tumors. However, the molecular role of AKT1 in the supporting cell lineage of the ovary is still poorly understood. To get insights into its function in such cells, we depleted *Akt1* in murine primary granulosa cells and assessed the molecular consequences at both the transcript and protein levels. We were able to corroborate the involvement of AKT1 in the regulation of metabolism, apoptosis, cell cycle, or cytoskeleton dynamics in this ovarian cell type. Consistently, we showed in established granulosa cells that depletion of *Akt1* provoked altered directional persistent migration and increased its velocity. This study also allowed us to put forward new direct and indirect targets of the kinase. Indeed, a series of proteins involved in intracellular transport and mitochondrial physiology were significantly affected by *Akt1* depletion. Using *in silico* analyses, we also propose a set of kinases and transcription factors that can mediate the action of AKT1 on the deregulated transcripts and proteins. Taken altogether, our results provide a resource of direct and indirect AKT1 targets in granulosa cells and may help understand its roles in this ovarian cell type. *Molecular & Cellular Proteomics* 18: 2–14, 2019. DOI: 10.1074/mcp.RA119.001461.

AQ: A

AQ:B-G,Fn1 The AKT/PKB¹ is the major downstream effector of the PI3K signaling pathway known to regulate a broad range of cellular functions such as: survival, proliferation, growth, metabolism, and migration (reviewed in (1, 2)). The AKT family comprises three widely expressed members, namely, AKT1/PKB α , AKT2/PKB β , and AKT3/PKB γ . However, the study of paralog-specific knockout mice have shown both redundant and distinct roles for the three *AKT* genes (3, 4). The prototypic AKT protein is highly conserved and contains three domains: an N terminus PHD, a central kinase domain, and a C terminus regulatory domain containing a hydrophobic motif. Activation

of the PI3K by different cytokines and growth factors leads to the production of PIP2/PIP3 (1). AKT interacts with membrane PIP3 thanks to its PHD. The protein kinase is thus transiently relocalized to the plasma membrane where it is phosphorylated by the phosphoinositide-dependent protein kinase 1 on Thr308 and by mammalian target of rapamycin complex (mTORC) 2 on Ser473, leading to its full activation (5, 6).

A number of AKT downstream target substrates have been described (1, 2, 7). For example, AKT promotes cell survival via the phosphorylation of proapoptotic factors like BCL2 associated agonist of cell death (8) or via the activation of the E3 ubiquitin ligase mouse double minute 2 homolog (9). Besides, it exerts genomic effects by modulating the activity of various TFs. For instance, by inhibiting the phosphorylation of forkhead box O factors, which leads to their export from the nucleus, AKT regulates cell survival, thus blocking the transcription of proapoptotic genes such as *BCL2 like 11* or *fas ligand* (10–12). It is also known to activate CREB1 and nuclear factor kappa B subunit (NF κ B) to promote cell survival (13, 14). Furthermore, AKT stimulates cell proliferation by inhibiting inhibitors of cell-cycle progression, like p27 (15) or by stabilizing proteins involved in cell-cycle entry by phosphorylation of their inhibitor, namely, the glycogen synthase kinase 3 (16). Another well-documented function of AKT is its role in promoting cell growth, which is achieved via the regulation of mTORC1, a critical regulator of translation initiation and ribosome biogenesis (17). AKT regulates nutrient uptake by regulating the localization of glucose transporter type 4 at the plasma membrane (18, 19) and promotes energy storage by inhibiting glycogen synthase kinase 3 (20). Angiogenesis and vascular remodeling are stimulated by the positive regulation of endothelial nitric oxide synthase by AKT in endothelial cells (21). Finally, AKT fosters cell migration and invasion, notably via the regulation of the actin cytoskeleton (22–24) and the secretion of matrix metalloproteases (25).

As a consequence of its central position in the physiology of the cell, AKT dysregulation is associated with several human diseases, including cancer. Indeed, many human cancers

AQ: aff From the ‡Institut Jacques Monod, Université Paris-Diderot, 75013 Paris, France; §Université Paris-Diderot, 75013 Paris, France
Received March 21, 2019
Published, MCP Papers in Press, April 16, 2019, DOI 10.1074/mcp.RA119.001461

Gene Network Dependent on AKT1 in Murine Granulosa Cells

show elevated activity of AKT (reviewed in (26)). This hyperactivity can result from mutations in genes encoding upstream regulators of AKT, like *PI3K* (27) or *phosphatase* and *TENs* homolog (28) and by rare mutations directly affecting *AKT* (29, 30). The most frequently reported *AKT* mutation, E17K, affects its PHD and results in an increased activity and a localization of to the plasma membrane (31). Point mutations of *AKT* are found spread all along the coding sequence (cBioPortal, <http://www.cbioportal.org/>). However, due to their low frequency, their status of drivers of tumorigenesis is not clear. Recently, we identified mutations affecting *AKT1* as a hallmark of juvenile granulosa cell tumors. Indeed, we found that more than 60% of the tumor samples studied bore somatic

in-frame tandem duplications affecting the PHD of *AKT1* whereas the others carried potentially damaging point mutations at conserved residues (32). Remarkably, the *AKT1* variants bearing the tandem duplications were insensitive to serum deprivation, they were constitutively hyper-phosphorylated, and this was associated with hyperactivity and relocalization to the plasma membrane (32). Importantly, the mutational analysis of four juvenile granulosa cell tumor samples bearing *AKT1* tandem duplications by RNA sequencing showed that these insertions were the sole detectable lesions common to the four tumors (33), strongly suggesting that they constitute the driving event in these tumors. However, little is known about the role of *AKT1* in granulosa cells at the molecular level. To date, only scarce data from studies performed in mouse knock-out models are available. *Akt1*^{-/-} female mice show reduced fertility due to altered follicular development and abnormal oocyte growth (34). In the *Akt1*^{-/-} ovaries, expression of cell-cycle positive regulators *Cyclin D1* and *Cyclin D3* are reduced as well as the expression of the anti-apoptotic factor *BCL2 like 1* and of the survival factor *KIT ligand* (34). No molecular analyses have been performed, particularly, in healthy granulosa cells that could help understand the pathophysiological roles of *AKT*.

In this study, we have performed high-throughput analyses of the proteins and transcripts deregulated after *Akt1* depletion in mouse pGCs, which are the supporting cells of germ cell development and function (35). We found multiple cellular processes perturbed by the *AKT1* KD, such as cytoskeleton regulation and focal adhesion. Consistently, we found that granulosa cells depleted for *Akt1* displayed an altered directional persistent migration. Taken together, our transcriptomic and proteomic data can help understand the role of *AKT1* in this critical ovarian cell type.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—Murine primary granulosa cells were collected from ovaries of 8-week-old female Swiss mice (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, France) and cultured as described in (36). The cell line AT29C derived from a mouse ovarian tumor was kindly provided by Dr. N. Di Clemente and cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) (37).

Transfection and Reagents—Cells were transiently transfected in six-well plates with 30 pmoles of a pool of three different siRNAs against *Akt1* (Dharmacon, Lafayette, Colorado; ON-TARGETplus siRNAs, pool KD1: J-040709-06-0005, J-040709-07-0005, J-040709-08-0005, KD2: J-040709-06-0005, J-040709-08-0005, J-040709-09-0005, KD3: J-040709-06-0005, J-040709-07-0005, J-040709-09-0005, and KD4: J-040709-07-0005, J-040709-08-0005, J-040709-09-0005) or 100 pmoles of a pool of two different siRNAs against *Creb1* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri SASI_Mm01_00191782 and SASI_Mm01_00191783), *Nfkb2* (Sigma-Aldrich, SASI_Mm01_00151272 and SASI_Mm01_00151273), or *Wt1* (Sigma-Aldrich, SASI_Mm01_00101396 and SASI_Mm01_00101398) or an equal amount of the nontargeting/scrambled siRNA (Dharmacon, D-001810-10-05) using Lipofectamine RNAiMax (Thermo Fisher Scientific). 5 h after transfection, the mix was replaced by culture

¹ The abbreviations used are: AKT, AKT serine/threonine protein kinase; 4E-BP1, eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1; ASCC1, activating signal cointegrator 1 complex subunit 1; BRD8, bromodomain containing 8; CALM1, calmodulin 1; Capn1, calpain 1; CBX1, chromobox 1; Cdhr1, cadherin-related family member 1; CEBPB, CCAAT enhancer binding protein beta; CREB1, cAMP-responsive element-binding protein 1; Crip1, cysteine-rich protein 1; CTBP1, C-terminal binding protein 1; DDX1, DEAD-box helicase 1; DDX3X, DEAD-box helicase 3 X-linked; DDX54, DEAD-box helicase 54; DEProts, proteins differentially expressed; DHX36, DEAH-box helicase 36; DPhospho, proteins differentially phosphorylated; Ecm1, extracellular matrix protein 1; EEF1D, eukaryotic translation elongation factor 1 delta; EIF2S2, eukaryotic translation initiation factor 2 subunit beta; ELP4, elongator acetyltransferase complex subunit 4; EMX2, empty spiracles homeobox 2; ENY2, transcription and export complex 2 subunit; Eri3, ERI1 exoribonuclease family member 3; FOXP1, forkhead box P1; GATA4, GATA-binding protein 4; GOT2, glutamic-oxaloacetic transaminase 2; GTF2E2, general transcription factor IIE subunit 2; HMGB2, high mobility group box 2; HNRNPK, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K; HSF1, heat shock transcription factor 1; KD, knock(ed)-down; Log2FC, log2fold change; MECP2, methyl-CpG-binding protein 2; MED23, mediator complex subunit 23; MED4, mediator complex subunit 4; MS, mass spectrometry; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1; mTORC2, mammalian target of rapamycin complex 2; Mvd, mevalonate diphosphate decarboxylase; NFE2L2, nuclear factor, erythroid 2 like 2; NFκB, nuclear factor kappa B subunit; Ovgp1, oviductal glycoprotein 1; Pdlim7, PDZ and LIM domain 7; PELP1, proline-, glutamate-, and leucine-rich protein 1; pGCs, mouse primary granulosa cells; PHD, pleckstrin homology domain; PHF6, PHD finger protein 6; PI3K, phosphoinositide3-kinase; PIP2/PIP3, phosphatidylinositol-di/trisphosphate; PIR, pirin; PKB, protein kinase B; PPI, protein-protein interactions; Ppib, peptidylprolyl isomerase B; PTM, posttranslational modifications; PTMA, prothymosin alpha; RBPMS, RNA-binding protein, mRNA-processing factor; RNAi, RNA interference; RNA-seq, RNA-sequencing; RNF2, ring finger protein 2; RTN4, reticulon 4; S100a16, S100 calcium-binding protein A16; S6K1/2, ribosomal protein S6 kinase B1/B2; SFR1, SWI5 dependent homologous recombination repair protein 1; Smarca2, SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 2; SRRM2, serine/arginine repetitive matrix 2; TCOF1, treacle ribosome biogenesis factor 1; TFAM, transcription factor A, mitochondrial; TFAP2C, transcription factor AP-2 gamma; TFs, transcription factors; TLE4, transducing-like enhancer of split 4; Tmem109, transmembrane protein 109; TSC1, tuberous sclerosis 1 protein; TSC2, tuberous sclerosis 2 protein; WT1, Wilms tumor 1; ZBED6, zinc finger BED-type containing 6.

Gene Network Dependent on AKT1 in Murine Granulosa Cells

medium, and cells were allowed to grow for 25 h before performing subsequent experiments.

RNA Extraction and Sequencing—RNA extraction was performed 30 h after transfection, following the acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (TRI)—reagent supplier's instructions (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio). 1.3 μg of total RNAs underwent high throughput sequencing at the IMAGIF platform (<https://www.i2bc.paris-saclay.fr/>, Gif-sur-Yvette, France). Specifically, total RNA quality was assessed on an Agilent Bioanalyzer 2100, using RNA 6000 pico kit (Agilent Technologies, Santa Clara, California). Directional RNA-Seq Libraries were constructed using the TruSeq mRNA Stranded library prep kit (Illumina, San Diego, California), following the manufacturer's instructions. Final library quality was assessed on an Agilent Bioanalyzer 2100, using an Agilent High Sensitivity DNA Kit. Libraries were pooled in equimolar proportions and sequenced on Single Read 75 pb runs, on an Illumina NextSeq500 instrument, using NextSeq 500 High Output 75 cycles kits. Demultiplexing was performed using bcl2fastq2 V2.15.0 and adapters were removed with Cutadapt1.9.1. Only reads longer than 10 pb were kept for analysis (about 10,000,000 reads per sample). Reads were mapped on the mouse genome (MM10) with TopHat2. Mapped reads were assigned to features with *features count* (1.5.0-p2).

RT-qPCR—The KD efficiencies were evaluated by RT-qPCR. RNA extraction was performed after 30 h of transfection. cDNA synthesis was performed with 1 μg of total RNAs after DNase treatment (New England Biolabs, Evry, France), using the M-MLV RT enzyme according to the manufacturer's protocol (Thermo Fisher Scientific). RT-qPCR was performed using the GoTaq qPCR Master Mix 5X (Promega, Madison, Wisconsin) in the Stratagene Mx3000P qPCR System. The primers used for each gene of interest are listed in **Supplemental Table S9**, *Saha* served as the reference gene. The results were analyzed and presented with Excel® (Microsoft, Redmond, Washington).

Western Blots—The KD efficiency was confirmed by Western blotting. Whole cell lysates were obtained using radioimmune precipitation assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, with 150 mM sodium chloride, 1.0% Igepal CA-630 (NP-40), 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% sodium dodecyl sulfate) 30 h after transfection. Lysates were sonicated for 10 min then cleared by centrifugation, and supernatants were kept for Bradford dosage. Protein extracts (20 μg) were denatured 5 min at 96 °C in NuPAGE LDS Sample Buffer 4X (Invitrogen, Carlsbad, California) containing 5% β -mercaptoethanol. Samples were loaded on a NuPAGE Novex 4–12% Bis-Tris Gel (Invitrogen) then transferred to a polyvinylidene difluoride membrane using the standard protocol of the iBlot2 Gel Transfer device (Invitrogen). After 1 h incubation with 5% nonfat milk in phosphate-buffered saline–1% Tween (PBS-T), the membrane was incubated with antibodies against AKT1/2/3 (H-136) (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas; #sc-8312), CREB1 (p-12) (1:200, Santa Cruz Biotechnology, #sc-377154), NF κ B2 (1:2 000, Abcam, Cambridge, UK, #ab109440), or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (1:1,000, Applied Biological Materials, Richmond, Canada; #G041) overnight at 4 °C. Membranes were then washed three times for 10 min and incubated with a 1:20,000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Cambridgeshire, UK; #111-035-003) or anti-mouse (Jackson ImmunoResearch Laboratories, #115-035-003) antibodies for 1 h 30 min. Blots were finally washed three times with PBS-T and revelation was performed with the SuperSignal WEST PICO Chemiluminescent Substrate (Pierce) according to the manufacturer's protocol. Acquisitions were realized using the ImageQuant LAS4000 software on the LAS4000 device (GE Healthcare, Chicago, Illinois). Bands intensity quantification and normalization of was performed with Fiji software (38).

Mass Spectrometry Analysis—

LC-MS/MS Acquisition—Protein extracts (30 μg) from control cells (control, three replicates), and siRNA for *Akt1* cells (KD1, KD2, K3, KD4, two replicates each) were precipitated with acetone at -20 °C during 3 h and incubated with 20 μl of 25 mM NH_4HCO_3 containing sequencing-grade trypsin (12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Promega) overnight at 37 °C. Peptides were desalted using ZipTip μ -C18 Pipette Tips (Millipore, Burlington, Massachusetts) and analyzed in a Q-Exactive Plus mass spectrometer coupled to a Nano-LC Proxeon 1000 equipped with an easy spray ion source (all from Thermo Fisher Scientific). Peptides were separated by liquid chromatography with the following parameters: Acclaim PepMap100 C18 precolumn (2 cm, 75 μm inner diameter, 3 μm , 100 Å), Pepmap-RSLC Proxeon C18 column (50 cm, 75 μm inner diameter, 2 μm , 100 Å), 300 nl/min flow rate, gradient from 95% solvent A (water, 0.1% formic acid) to 35% solvent B (100% acetonitrile, 0.1% formic acid) over a period of 98 min, followed by a regeneration column for 23 min, giving a total run time of 2 h. Peptides were analyzed in the Orbitrap cell (Thermo Fisher Scientific), in full ion scan mode, at a resolution of 70,000 (at m/z 200), with a mass range of m/z 375–1,500 and an automatic gain control target of 3×10^6 . Fragments were obtained by high collision-induced dissociation activation with a collisional energy of 30%, and a quadrupole isolation window of 1.4 Da. MS/MS data were acquired in the Orbitrap cell in a Top20 mode, at a resolution of 17,500, with an automatic gain control target of 2×10^5 , with a dynamic exclusion of 30 s. MS/MS of most intense precursors was first acquired. The maximum ion accumulation times were set to 50 ms for MS acquisition and 45 ms for MS/MS acquisition.

Peptide and Protein Identification and Quantification—Label-free relative quantification was performed in between subject analysis using Progenesis-Qi software 4.0 (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle, UK). For the identification step, all MS and MS/MS data were processed with the Proteome Discoverer software (Thermo Scientific, version 2.1) coupled to the Mascot search engine (Matrix Science, version 2.5.1, London, UK). The mass tolerance was set to 6 ppm for precursor ions and 0.02 Da for fragments. The maximum number of missed cleavages was limited to two for the trypsin protease. The following variable modifications were allowed: oxidation (Met), phosphorylation (Ser, Thr, Tyr), acetylation (Protein N-term). The SwissProt database (02/2017, #16854) with the *Mus musculus* taxonomy was used for the MS/MS identification step. Statistical methods are developed in the “Experimental Design and Statistical Rationale” section.

In Silico Analyses—To reveal the different cellular processes affected by *Akt1* depletion, we used GeneMania (<https://genemania.org/>) to build a network based on the physical interactions referenced to occur among the 364 DEProts and 8 DPhospho peptides. Of the 336 proteins included in the analysis 158 were connected within the network and 178 remain isolated. For such orphan deregulated proteins, we used GeneCards database (<https://www.genecards.org/>) to explore their implication in any cellular process. Enrichment analyses were performed with Gene Set Enrichment Analysis database (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). We chose to illustrate the processes having at least five proteins in the overlap with published datasets. Cytoscape was used to draw and display the network (39).

To identify the DPhospho peptides, we first plotted the values of Log2FC expression versus the values of Log2FC phosphorylation. To make the intercept equal to 0, we subtracted the offset of the trend line (*i.e.* 0.485) to the log2FC phosphorylation values. Next, we calculated the normalized differences between Log2FC expression (A) and corrected Log2FC phosphorylation (B) for each differentially phosphorylated peptide identified ($[(\max(A,B) - \min(A,B))/(A + B)]$). Then, we detected the DPhospho peptides as the outliers using the Iglewicz and Hoaglin's test (setting the modified Z score ≥ 1 , <http://contchart.com/outliers.aspx>). We used GPS3.0 (<http://gps.biocuckoo>

Gene Network Dependent on AKT1 in Murine Granulosa Cells

org) and PhosphoNET (<http://www.phosphonet.ca/default.aspx>) as prediction tools to identify the kinases potentially involved in the phosphorylation of the phosphosite of interest. The list of known kinase substrates of AKT1 was retrieved from the PhosphoSite Plus website (<https://www.phosphosite.org/homeAction>). GeneMania and Cytoscape were used to draw a network.

AQ: K To identify the TFs potentially implicated in the regulation of the differentially expressed mRNAs (DE-mRNAs), we submitted the list of the DE-mRNAs to EnrichR database (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>), focusing on the TF-LOF tab, which corresponds to gene expression signatures extracted from the gene expression omnibus (GEO) database for TF perturbations. We kept the TFs with nominal p value < 0.05 .

AQ: L

Cell Migration Assays—Cell velocity was assessed by a scratch-wound assay. AT29C cells of the control and KD conditions were trypsinized 24 h after transfection. 3.5×10^5 cells were plated in 24-well plates. When cells reached confluence, a thin wound was performed by scratching the culture with a pipette tip. Acquisitions of images of wound closure were performed using the IncuCyte ZOOM live-cell analysis system (Essen BioScience, Hertfordshire, UK). Images of three fields along the diameter of the well were taken at 4X magnification with the Basler scout scA1400–30gm monochrome camera every 2 h during 12 h. The wound closure was measured as described in “Experimental Design and Statistical Rationale.”

Cell directional migration was assessed by letting the cells migrate on a fibronectin pattern. First, cleaned silanized glass coverslips were coated with polydimethylsiloxane (PDMS) (40). For micropattern printing, 200- μ m wide PDMS stamps were prepared by pouring a PDMS solution (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, Michigan) and allowing it to polymerize at 60 °C overnight (41). The PDMS stamps were pulled off and incubated face up for 45 min at room temperature with fibronectin. After several washes with deionized water, the stamps were dried and applied onto silanized glass coverslips, then the printed areas were blocked with 3% BSA, 0.2% Pluronic (Thermo Fisher Scientific) for 1 h at room temperature. The silanized glass coverslips were then dropped into a six-well plate. AT29C cells of the control and KD conditions were trypsinized 24 h after transfection. 10^5 cells were plated on a small portion of the printed area delimited by a PDMS barrier so that the cells could not spread. When adherent, the PDMS barrier was removed and cell migration on a fibronectin matrix was imaged at 10X magnification with the AxioCam HRc camera (Zeiss, Oberkochen, Germany) on the Axio Observer Z.1 microscope (Zeiss), every 30 min during 24 h. Analysis was performed as described in “Experimental Design and Statistical Rationale.”

Experimental Design and Statistical Rationale—For the analysis of *Akt1* KD by RNA sequencing and MS, three control samples (CTRL) and eight KD samples were provided to the corresponding platform (see previous sections). CTRL samples were derived from cells transfected with nontargeting/scrambled siRNA (Dharmacon, D-001810-10-05), and KD samples were derived from cells transfected a pool of three different siRNAs against *Akt1* (Dharmacon, ON-TARGETplus siRNAs, pool KD1: J-040709-06-0005, J-040709-07-0005, J-040709-08-0005, KD2: J-040709-06-0005, J-040709-08-0005, J-040709-09-0005, KD3: J-040709-06-0005, J-040709-07-0005, J-040709-09-0005, and KD4: J-040709-07-0005, J-040709-08-0005, J-040709-09-0005).

For RNA-sequencing, differential analysis was performed with DESeq2, comparing the three CTRL samples results to the eight KD results. The p values were adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method, and those with an adjusted p value < 0.05 were considered to be significant.

For MS, peptide identifications were validated using a 1% false discovery rate threshold calculated with the Percolator algorithm. The ptmRS node from Proteome Discoverer 2.1 was used to provide a confidence measure of phosphorylated positions for each identified

peptides. Phosphorylated peptides with a ptmRS binomial peptide score above 50 were further considered (42). Protein abundance variations were measured according to the Hi-3 label-free quantification method and validated if their analysis of variance (Anova) p values were under 0.05. However, 224 proteins were not detected in all the samples. For these cases, we kept the proteins detected in at least 2/3 of samples for the control condition and 5/8 of samples for the KD condition. Statistical significance was then evaluated by a Student's t test. By this method, we detected 18 proteins with significant uncorrected p values, among which 13 had a $\text{Log}_2\text{FC} > 1.5$ in either direction. After a Bonferonni correction, only one protein, RPS6KA2, remained significantly differentially expressed. The MS proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (43) partner repository with the dataset identifier PXD012548 as .raw files, Proteome Discoverer 2.1 .pdResult file, associated pep.xml and xlsx files, and label-free report generated by Progenesis Q1.

For the scratch-wound assay, three independent experiments were performed, with two wells used for CTRL and KD1 condition at each experiment. The wound closure was measured by calculating the decrease of the wound area over time with respect to the initial area ($\text{area}_t/\text{area}_{t_0}$) using Fiji software. The slope of the line generated in the two conditions was estimated using a curve fitter online tool (<http://statpages.info/nonlin.html>), then the significance of the difference between the slopes of the KD and control conditions were estimated using an online statistic calculator (44).

For directional migration, the experiment was performed twice. Cells of CTRL and KD1 conditions were seeded on approximately 10 lanes of fibronectin matrix (200- μ m width) per experiment. Cell trajectories were manually obtained using the “manual tracking” plugin of Fiji software and monitoring the displacement of the nucleus in each frame. We estimated θ , the absolute value in degrees of the angle generated by the displacement of the nucleus between two time points A and B as the absolute value of $\text{Arctan}((y_B - y_A)/(x_B - x_A))$. Then directionality was calculated as the ratio between the sum of the absolute values of the angles θ and the distance traveled by the cell ($x_{\text{MAX}} - x_{\text{MIN}}$). The smaller this directionality value is the more persistent is the movement of the cell. As the directionality value increases, because of the increase of the sum of the angles generated by the cell, the more random its migration is. Three to four cells of the leading edge were tracked per fibronectin matrix. 56 cells were tracked in the first experiment ($n_{\text{control}} = 27$, $n_{\text{KD}} = 29$, $p = 0.02307$) and 71 in the second one ($n_{\text{control}} = 37$, $n_{\text{KD}} = 34$, $p = 0.00027$). A Student's t test was used to assess significant differences between the two conditions. Data were plotted using R.

RESULTS

Comparison of MS and RNA-seq Data from AKT1-depleted Cells Suggests the Existence of Pervasive Posttranslational Events Affecting the Deregulated Proteins/Genes—To obtain an overview of the molecular events dependent on AKT1 in pGCs, we silenced *Akt1* using RNA interference. RT-qPCR, and Western blotting analyses confirmed a depletion greater than 90% at the transcript level and of about 50% at the protein level in the KD conditions. MS analyses revealed 678 differentially expressed proteins ($p < 0.05$) between cells treated with the siRNAs targeting *Akt1* (four combinations of three different anti-*Akt1* siRNAs in duplicate, $n = 8$) and those treated with the scramble siRNA (three replicates) (Fig. 1, [Supplemental Table S1](#); see [Supplemental Table S2](#) for all protein and peptide identifications and [Supplemental Table S3](#) for all

AQ: M

F1,ZSI
ZSI
ZSI

Gene Network Dependent on AKT1 in Murine Granulosa Cells

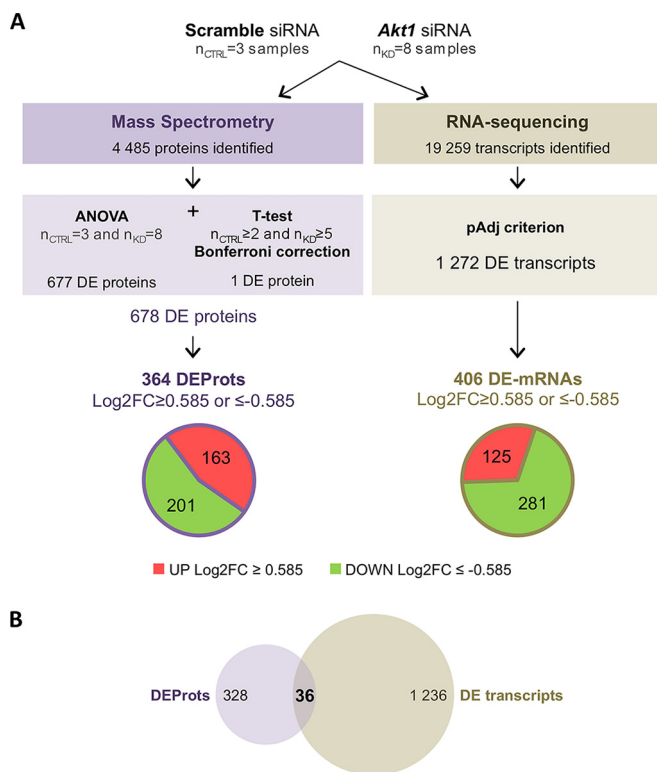


FIG. 1. Comparison of mass spectrometry and RNA-sequencing data performed in murine primary granulosa cells. (A) Three samples of pGCs transfected with scramble siRNA and eight samples (four combinations of three siRNA in duplicate) of pGCs depleted for *Akt1* were subjected to mass spectrometry and RNA-sequencing. Out of 4 485 proteins that were identified by MS, 678 proteins were considered to be differentially expressed, of which 364 had a Log_2FC of variation equal or greater than 0.585 in both directions (DEProts). The downregulated subset comprised 163 proteins with a mean $\text{Log}_2\text{FC} = -0.92$, whereas the 201 up-regulated proteins had mean $\text{Log}_2\text{FC} = 1.05$. Out of 19,259 transcripts were identified by RNA-sequencing, 1,272 transcripts were considered differentially expressed between the KD and control conditions ($p < 0.05$), of which 406 had a Log_2FC of variation equal or greater than 0.585 in both directions (DE-mRNAs, 281 were downregulated, with a mean $\text{Log}_2\text{FC} = -0.71$, and 125 up-regulated with a mean $\text{Log}_2\text{FC} = 0.73$). (B) Venn diagram representing the overlap between the deregulated proteins and the genes deregulated at the transcript level after *Akt1* depletion.

protein and peptide quantification). In our subsequent analyses, we focused on the 364 proteins having a $\text{Log}_2\text{FC} \geq 0.585$ or ≤ -0.585 , which corresponds to a fold change ≥ 1.5 in either direction (DEProts). Specifically this subset included 163 downregulated and 201 up-regulated proteins (Fig. 1A, Supplemental Fig. S1). In parallel, the analysis of RNA-seq data revealed 1,272 differentially expressed transcripts (DE-mRNAs, $p < 0.05$) between KD and control cells (Fig. 1A, Supplemental Table S4). Among them, we focused on the 406 having a $\text{Log}_2\text{FC} \geq 0.585$ or ≤ -0.585 , out of which 281 were downregulated and 125 up-regulated.

Among the 364 DEProts, 355 had a transcript identified in the RNA-seq data and only 36 corresponding transcripts were significantly deregulated (Fig. 1B). As further discussed be-

low, this suggests the existence of pervasive posttranslational processes affecting the deregulated proteins. The expression of 25 proteins changed in the same direction as that of the corresponding transcript, and 11 changed in the opposite direction. The 25 proteins mentioned above involve regulators of cell cycle, gene expression, protein production, metabolism, intracellular transport, and the actin cytoskeleton (Supplemental Table S5).

Differentially phosphorylated peptides and kinases potentially acting downstream of AKT1—MS data revealed peptides with different posttranslational modifications and, as expected, phosphorylation. Thus, we aimed to identify the proteins differentially phosphorylated (DPhospho) after *Akt1* KD.

The MS experiment allowed us to identify 250 phosphorylated peptides, but only 20 peptides appeared to be differentially phosphorylated between the KD and the control conditions (Supplemental Table S6; see Supplemental Table S2 for all protein and peptide identifications and Supplemental Table S3 for all protein and peptide quantification). To determine which of these peptides were actually differentially phosphorylated (*i.e.* not following a similar difference in protein expression), we compared their Log_2FC phosphorylation with the Log_2FC expression of the relevant proteins (Fig. 2A).

We found that some of the peptides were perfectly aligned with the trend line of Fig. 2A (where differential phosphorylation correlates with differential expression) while others were not. To objectively identify the peptides for which changes in phosphorylation were independent of expression changes, we normalized the difference between Log_2FC phosphorylation and Log_2FC expression for each peptide and spotted the outliers (*i.e.* DPhospho peptides) as described in the “Materials and Methods” section. This allowed us to pinpoint 8 differentially phosphorylated peptides (DPhospho, $p < 0.05$) derived from β -catenin, RTN4, EEF1D, CALM1, GOT2, EIF2S2, SRRM2, and PTMA (Fig. 2A, Supplemental Table S6).

According to GeneCards (45), such proteins are involved in the regulation of the cytoskeleton and cell adhesion, mRNA/protein production via splicing and translation processes, amino acid metabolism, immune function, and G-protein signaling. The peptides derived from β -catenin, RTN4, EEF1D, and CALM1 showed a decreased phosphorylation level upon *Akt1* KD. These proteins can thus be potential direct targets of AKT1. In contrast, those derived from GOT2, EIF2S2, SRRM2, and PTMA displayed an increased phosphorylation after *Akt1* silencing. Such proteins are thus potential targets either of kinases inhibited by AKT1 or of phosphatases activated by AKT1.

Next, we used GPS3.0 and PhosphoNET prediction tools to uncover candidate kinases that could be responsible for the phosphorylation of the DPhospho peptides. We kept the kinases predicted by both softwares to regulate at least three DPhospho peptides and that were expressed in the pGCs according to our MS experiment ($n = 12$ kinases, AKT1 being one of them). We also included in our analysis the kinases and

Gene Network Dependent on AKT1 in Murine Granulosa Cells

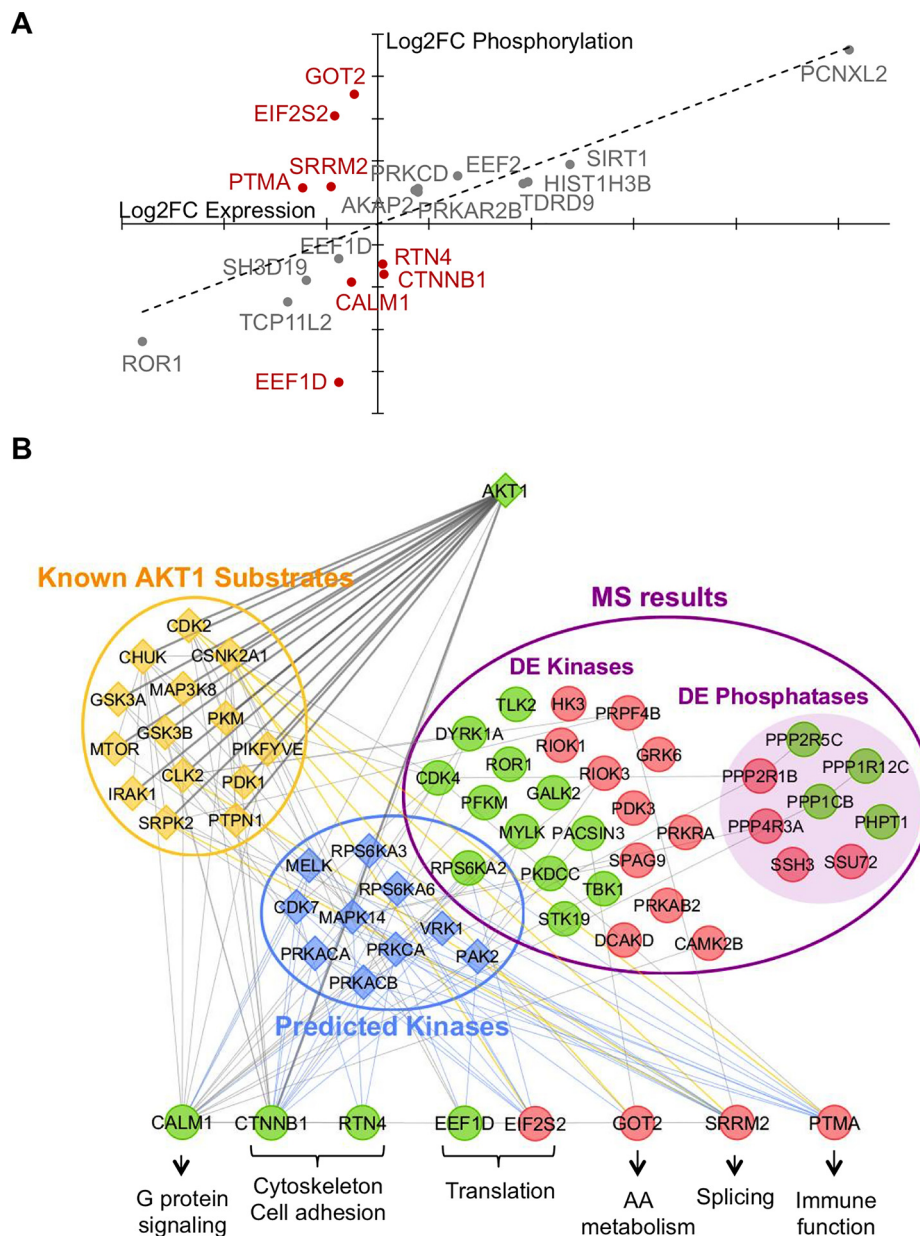


FIG. 2. **Identification of the peptides differentially phosphorylated after *Akt1* depletion.** (A) The scatterplot of the Log2FC values resulting from differentially expressed proteins and differentially phosphorylated peptides reveals two distinct populations of phosphorylated peptides. In gray, the peptides displaying the same variation of phosphorylation and expression were not considered to be differentially phosphorylated. In deep red, the peptides displaying a variation of phosphorylation independent of the variation of the expression of the relevant proteins were considered as DPhospho peptides. (B) Model for the regulation of the DPhospho peptides. The network was built using GeneMania and Cytoscape searching for the PPI existing between the 8 DPhospho peptides, the 12 predicted kinases, the 30 DE kinases and DE phosphatases, and the kinases referenced in the PhosphoSite Plus database as AKT1 substrates (known AKT1 substrates, $n = 46$). Only the nodes connected to the DPhospho peptides were taken into account. GeneCards helped with the attribution of the DPhospho peptides to cellular processes. Green nodes: down-regulated/phosphorylated. Red: up-regulated/phosphorylated. Bold edges show AKT1 direct targets. Blue edges are predicted by GPS3.0 and PhosphoNET. Light orange edges connect up-regulated DPhospho peptides with known kinase substrates of AKT1.

phosphatases differentially expressed in the MS data (DE kinases and phosphatases). Next, we used GeneMania to build a network based on the protein-protein interactions (PPI) occurring between the 8 DPhospho peptides, the 12 predicted kinases, 30 DE kinases and phosphatases, and those

referenced in the PhosphoSite Plus database as being AKT1 substrates ($n = 46$). As a result, we obtained a highly connected PPI network involving a series of kinases and phosphatases that could mediate AKT1 (direct and indirect) action on the DPhospho peptides (Fig. 2B).

Gene Network Dependent on AKT1 in Murine Granulosa Cells

Pathways dependent on AKT1 in mouse granulosa cells—To get a global picture of the cellular pathways responding to AKT1 in mouse pGCs, we employed GeneMania to investigate the connections existing between the DEProts and DPhospho peptides. Enrichment analyses were performed using the Gene Set Enrichment Analysis database (46, 47). In addition, we used GeneCards to explore the biological functions of deregulated proteins not involved in the enriched processes. As expected, numerous pathways were significantly affected by *Akt1* depletion (Fig. 3, [Supplemental Table S7](#)). These pathways are related to gene expression and protein production [translation ($p = 2.86E-3$), ribosome biogenesis ($p = 5.22E-3$), rRNA processing ($p = 4.25E-4$), mitochondrial translation ($p = 2.02E-2$), mRNA surveillance ($p = 3.48E-2$), RNA splicing ($p = 1.62E-2$)], metabolism [of lipids and lipoproteins ($p = 2.78E-5$), glucose ($p = 5.32E-4$) and of amino acid and derivatives ($p = 1.04E-2$)], and intracellular transport [(vesicle-mediated transport ($p = 7.2E-3$) and mitochondrial protein import ($p = 5.93E-3$)]. We also found significant enrichment of the pathways related to respiratory electron transport ($p = 4.07E-2$), posttranslational modifications (PTM, $p = 2.16E-3$), apoptosis ($p = 6.24E-4$), cell cycle ($p = 1.61E-2$), actin cytoskeleton regulation ($p = 1.47E-2$), and focal adhesion ($p = 1.06E-2$).

In silico analyses of the DE-mRNAs point to transcription factors potentially targeted by AKT1—The transcriptional impact of AKT1 can be due to an indirect modulation of the expression of a set of TFs and/or their posttranslational modification. In the former category, we found 28 TFs and regulators whose expression was deregulated by the AKT1 depletion. Such DE-TFs belonged to different categories: specific TFs (CREB1, CEBPB, FOXP1, NF κ B2, PELP1, TFAM, and ZBED6), general TFs (GTF2E2), epigenetic effectors (BRD8, CBX1, ENY2, HMGB2, MECP2, and PHF6), and transcription co-factors/regulators (ASCC1, CTBP1, DDX1, DHX36, DDX3X, DDX54, ELP4, HNRNPK, MED23, MED4, PIR, RBPMS, SFR1, and TLE4).

To identify other TFs whose direct and indirect targets in other tissues were also differentially expressed according to our RNA-seq data, we submitted the list of the 406 DE-mRNAs to the EnrichR database. This analysis allowed us to uncover nine TFs, namely, GATA4, RNF2, NFE2L2, CREB1, TFAP2C, HSF1, WT1, TCOF1, and EMX2, which become direct or indirect candidate targets of AKT1 themselves (Fig. 4A, [Supplemental Table S8](#)). Interestingly, CREB1 is a known target of AKT1 that appears downregulated in our MS data. We further studied the involvement of such TFs as potential effectors acting downstream of AKT1 by assessing whether some of their known targets (according to EnrichR, that are also deregulated in our RNA-seq data) were indeed deregulated after their own KD in mouse granulosa cells. To conduct this study, we focused on DE-mRNAs known to be expressed at more than five reads

per kilobase per million mapped reads in the mouse ovary (according to the Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) consortium transcriptome data). RNA-seq data for the selected target genes were validated by RT-qPCR in mouse pGCs KD for *Akt1*. For simplicity, we performed a similar experiment in AT29C cells that are widely used as a model of granulosa cell biology (37). Moreover, the proteomes of both cell types are quite similar (Pearson's $r = 0.70$ and two-tailed $p < 0.001$) ([Supplemental Fig. S2](#)). As expected, we obtained a strong correlation (Pearson's $r = 0.75$, two-tailed $p < 0.001$) between the AKT1 KD results for a set of 35 genes (targets in other tissues of the TFs mentioned above) in the two cell types (Fig. 4B). Thus, we performed the KD of several TFs of interest, *Creb1*, *Nfkb2*, and *Wt1*, in the AT29C cells (Fig. 4C, [Supplemental Fig. S3](#)). The KD of *Creb1* produced a similar deregulation of *Ecm1*, *Pdlim7*, *Ppib*, and *S100a16* as the depletion of *Akt1* (Fig. 4D). Thus, it is likely that AKT1 regulates these genes through its action on CREB1 expression. As *Crip1*, *Smarca2*, and *Ups11* did not change in the same direction between *Creb1* KD and *Akt1* KD, it is unlikely that AKT1 regulates these genes through its action on CREB1 in these cell lines. We conducted similar KD experiments on *Nfkb2*, which is a known target of AKT1 and whose expression is up-regulated according to the MS data and on *Wt1*, which is a key factor of granulosa cell lineage differentiation and ovarian function (48). The latter displayed the biggest absolute overlap between the DE-mRNAs and WT1 direct and indirect targets according to EnrichR database. As NF κ B2 was up-regulated following *Akt1* silencing, we expected that the effect of its KD on its targets would mirror the results of *Akt1* depletion. Consistently, the up-regulation of *Cdhr1* and *Ovgp1* observed after *Akt1* KD could be the consequence of its regulation of NF κ B2. The KD of *Wt1* had a similar effect on *Capn1*, *Eri3*, *Mvd*, *Ppib*, and *Tmem109* as the *Akt1* depletion (Fig. 4D). Thus, we hypothesize that AKT1 regulates these genes via a direct or indirect action on WT1.

Granulosa cells depleted for Akt1 show altered migration patterns—As several DEProts were related to cell adhesion, cytoskeleton regulation and extracellular matrix organization (Fig. 3, [Supplemental Table S5](#)), which are critical processes for cell migration, we studied the migration potential of AT29C cells depleted for *Akt1*. The velocity of migration was assessed using a scratch-wound assay (Fig. 5A). Specifically, the speed of wound healing was followed by measuring the slope of the line representing the area noncovered by migrating cells (relative to the initial wounded surface) *versus* time in both conditions (control and KD). Interestingly, the slope was significantly steeper in the KD (slope = -0.078 h^{-1}) compared with the control condition (slope = -0.064 h^{-1}) (t test, $p = 5.5E-4$) meaning that *Akt1* depletion increases migration velocity in this experimental setting. We also studied directional migration on a fibronectin matrix by using an insert-

AQ: O

ZSI

ZSI

F3,ZSI

AQ: N

F4,ZSI

ZSI

F5

Gene Network Dependent on AKT1 in Murine Granulosa Cells

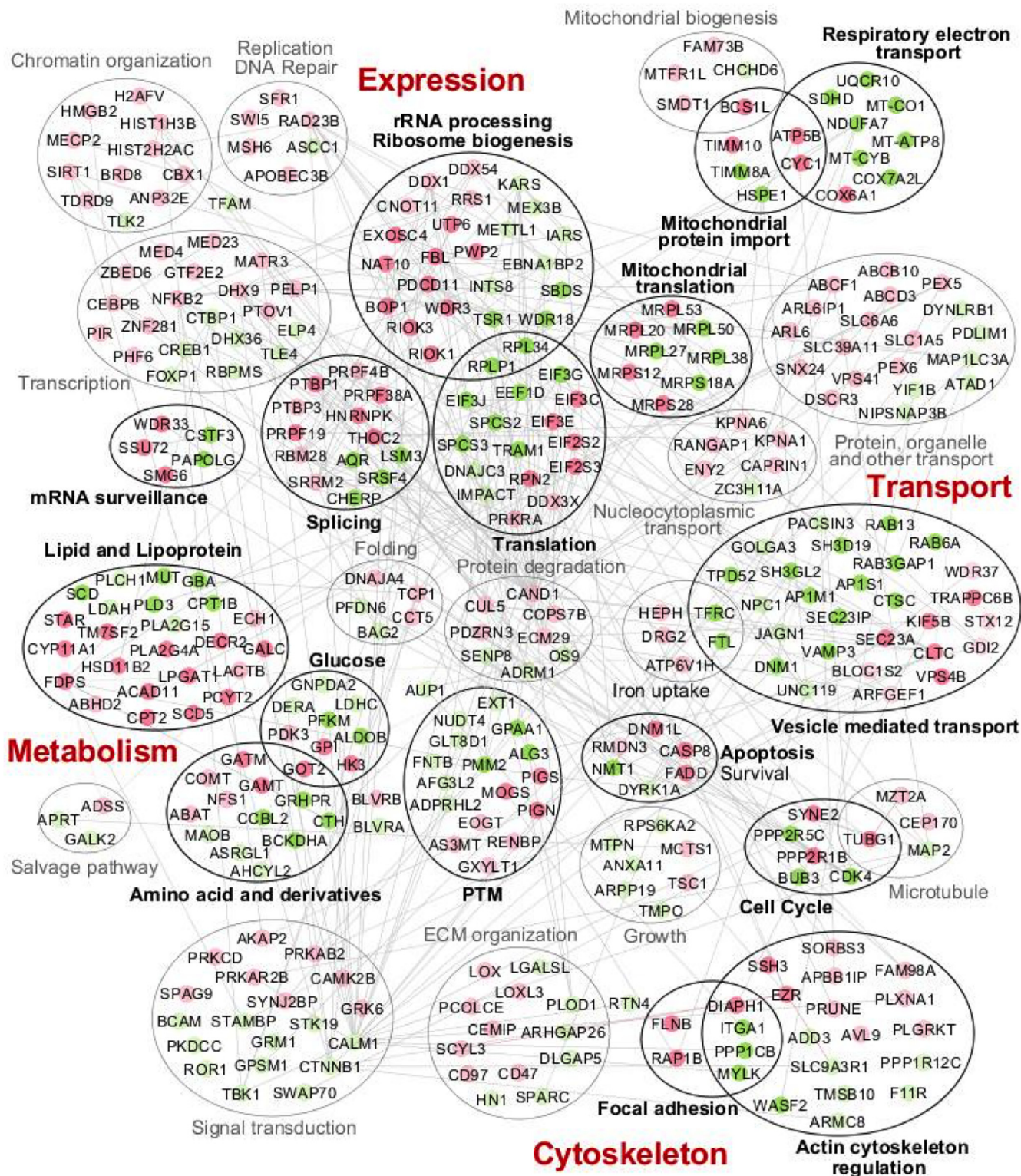


Fig. 3. Pathways responding to *Akt1* depletion. The list of DEProts and DPhospho peptides obtained after *Akt1* depletion was submitted to GeneMania and GSEA to gain insights into the pathways affected by this perturbation. Circles filled with dark green/red color represent downregulated/up-regulated proteins involved in significantly enriched pathways/processes (surrounded by black ellipses with bold labels). The light green/red circles represent proteins that were manually assigned to different cellular processes following GeneCards (surrounded by gray ellipses). The main pathways impacted concern gene expression and protein production, metabolism, cytoskeleton regulation, and transport.

Gene Network Dependent on AKT1 in Murine Granulosa Cells

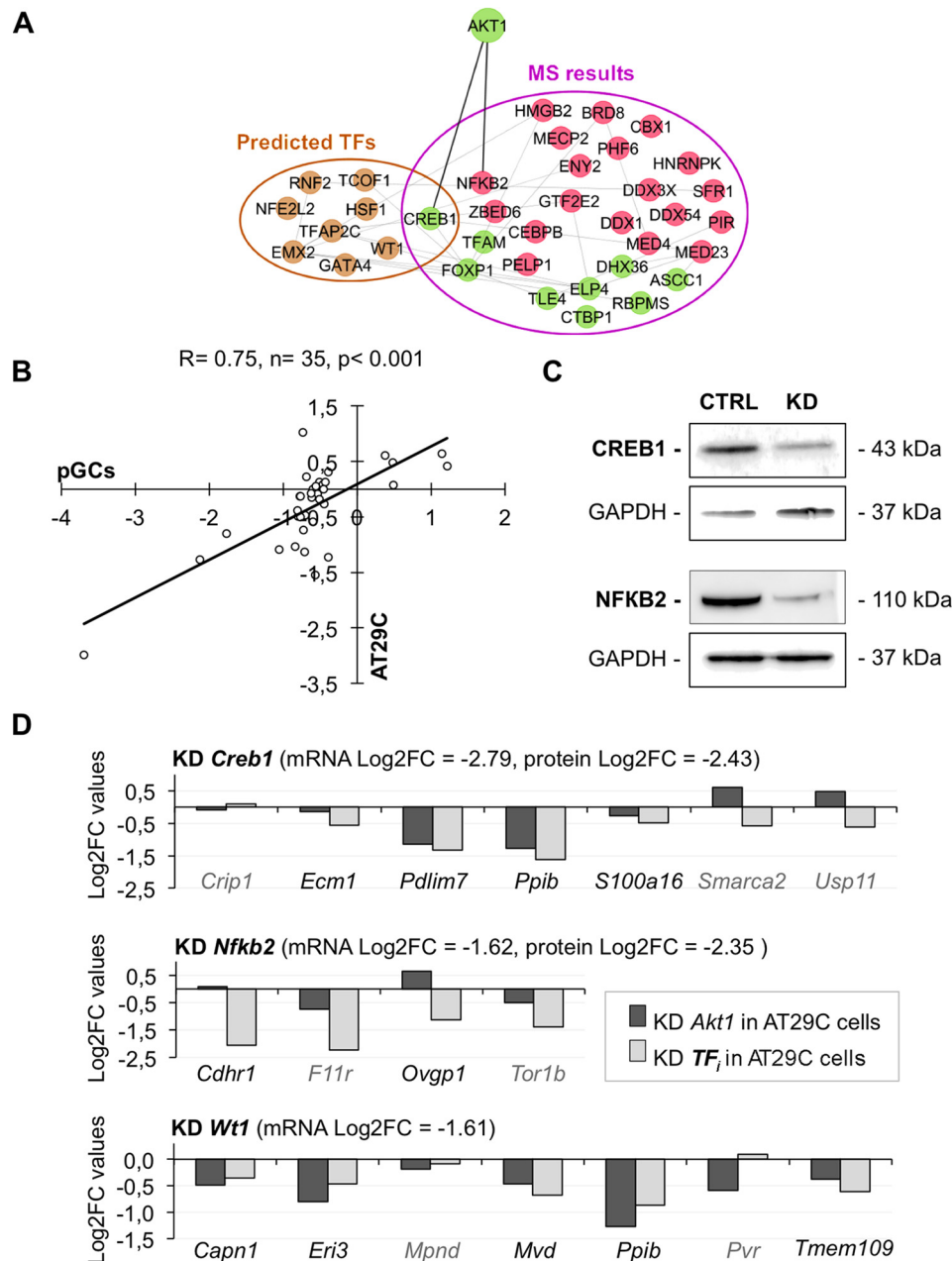


FIG. 4. Exploration of the genomic effects of AKT1. (A) Model for the regulation of the DE-mRNAs. The DE-mRNAs could result from deregulation of TFs and regulators identified by MS (MS results) or predicted by EnrichR (predicted TFs). (B) Scatterplot of the Log2FC values for the 35 differentially expressed genes in primary granulosa cells or in AT29C after *Akt1* depletion, corresponding to the potential transcriptional targets of *Creb1*, *Nfkb2*, and *Wt1* identified *in silico* using EnrichR. A significant correlation between the two cell types ($r = 0.75$, $p < 0.001$) is apparent. (C) Efficiency of CREB1 and NFKB2 depletion after 30 h of KD. The mean KD efficiency studied by Western blotting is of about 80% for each TF. (D) Effect of *Creb1*, *Nfkb2*, or *Wt1* down-regulation on the expression of transcripts dependent on *Akt1*. The KD of *Creb1*, *Nfkb2*, or *Wt1* was performed in AT29C cells. In each KD condition, we assessed the expression of the DE-mRNAs predicted by EnrichR to be the target of the TF of interest. Dark gray bars: Log2FC values obtained by RT-qPCR after *Akt1* depletion in AT29C cells. Light gray bars: Log2FC values obtained by RT-qPCR after depletion of the TF of interest (TF_i) in AT29C cells.

removal approach (Figs. 5B–5D). Specifically, 24 h after insert removal, we studied the ability of KD and control cells at the leading edge to migrate by tracking them. We assessed the persistent *versus* random behavior of migration by calculating the sum of the absolute values of the angles θ generated by

the movements of the nuclei at various time points divided by the distance d traveled by the relevant nuclei (Fig. 5B). AT29C cells KD for *Akt1* showed more random motility when compared with the control condition (t test, $p = 0.023$, Figs. 5C and 5D).

Gene Network Dependent on AKT1 in Murine Granulosa Cells

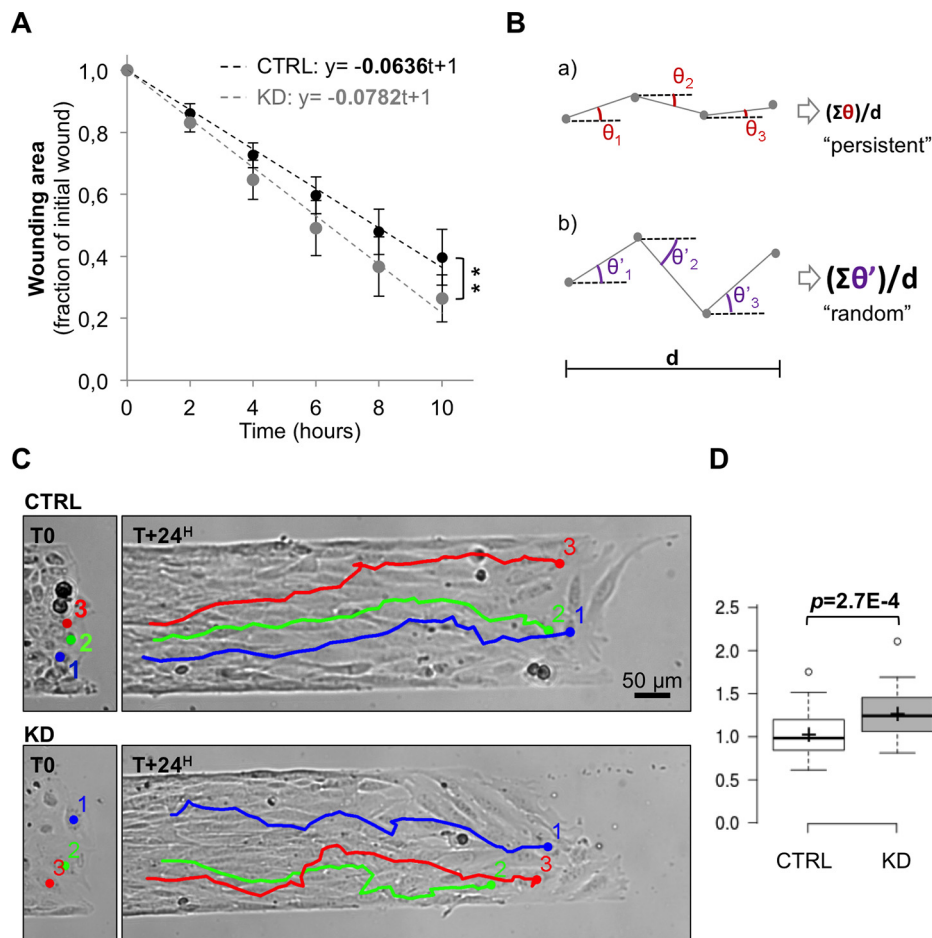


FIG. 5. *Akt1* depletion alters the migration patterns of AT29C cells. (A) Result of the scratch-wound assay. We plotted the mean wounded cell-free area expressed as a fraction of that of the initial wound, in control and KD conditions. The experiment was repeated three times. The slopes of the lines (representing the rate of decrease of the wounded/cell free area) were significantly different ($p = 5.5E-4$). (B) Outline of our analysis of directional persistence migration. The persistent *versus* random behavior of migration was determined by calculating the sum of the absolute value in degrees of the angles θ , generated by the movements of the nucleus between two time points A and B divided by the distance traveled by the cell ($x_{MAX} - x_{MIN}$). In the case (a), the angles θ generated by the cell migration are smaller than in the case (b). Thus, the smaller is the value obtained, the more persistent is the trajectory. (C) Example of AT29C cell trajectories on fibronectin patterns after *Akt1* depletion or not. The directionality of AT29C cell migration was measured after tracking the displacement of each nucleus. (D) Quantification of the directionality of AT29C cell migration after *Akt1* depletion. Increased random migration is observed in the KD condition compared with the control. The experiment was performed twice, 56 cells were tracked in the first experiment ($n_{control} = 27$, $n_{KD} = 29$, $p = 0.02307$) and 71 in the second one ($n_{control} = 37$, $n_{KD} = 34$, $p = 0.00027$). A Student's *t* test was used to assess significant differences between the two conditions.

DISCUSSION

Here, we used RNAi to deplete *Akt1* in mouse pGCs, then performed RNA-seq and MS experiments to obtain an overview of the cellular pathways and molecular events depending on this kinase in this ovarian cell type that supports germ cell development. We found that the majority of DEProts were not deregulated at the transcript level, suggesting the existence of a posttranscriptional events impacting on the translation or the stability of such proteins. Consistently, among the main pathways responding to AKT1 depletion, we found significant enrichment of protein production processes, comprising mRNA surveillance and translation (Supplemental Table S7, Fig. 3). Proteins involved in the regulation of protein folding and degradation were also significantly deregulated.

We found several TFs and regulators affected by *Akt1* depletion that could explain the transcriptional changes observed in the RNA-seq data. In addition, they could be due, at least in part, to posttranslational modifications of TFs not identified in MS data. In the latter category, we identified nine TFs through *in silico* analyses as they share transcriptional targets with AKT1 when depleted in other models (Supplemental Table S8). It is noteworthy that several of them have been shown to play key roles in ovarian development and function (such as EMX2 (49), GATA4 (50), WT1 (48), RNF2 (51)) or in the stress response in the ovary (NFE2L2 (52), HSF1 (53)). We confirmed that the KD of *Creb1* or *Wt1* in AT29c cells produced similar effects for a subset of transcriptional targets as those of *Akt1*. Thus, we speculate that CREB1 and WT1 act

Gene Network Dependent on AKT1 in Murine Granulosa Cells

downstream of AKT1 to mediate some of its genomic effects also in primary granulosa cells. Interestingly, activating phosphorylation of CREB1 by AKT has been reported in human embryonic kidney 293T cells and leads to the regulation of the expression of genes involved in cell survival (13). Besides, AKT1 has been shown to increase WT1 expression in breast cancer cells to regulate cell cycle progression and apoptosis (54).

Our MS experiment was not designed to focus on DPhospho peptides (*i.e.* through artificial enrichment) but to provide an overview of the global deregulation occurring at the protein level. However, we were able to detect eight DPhospho peptides (Supplemental Table S6). As noted above, those derived from β -catenin, RTN4, EEF1D, and CALM1 could represent potential direct targets of AKT1. Consistently, β -catenin, a key downstream effector of the WNT signaling pathway, is a known substrate of AKT1. Indeed, phosphorylation of β -catenin by AKT1 at Ser552 increases its transcriptional activity (55). According to PhosphoNET, Ser675 is also predicted to be phosphorylated by AKT1. Along similar lines, Ser15 of RTN4 (reticulation 4), a protein involved in membrane trafficking, has been shown to be sensitive to mTORC1 inhibition (56). As mTORC1 is regulated by AKT1, RTN4 phosphorylation could at least indirectly depend on AKT1 via mTORC1. Regarding the two other downregulated DPhospho peptides, EEF1D and CALM1, we are the first to report their sensitivity to AKT1 (depletion), and further work is required to explore the biological relevance of our findings. The peptides derived from GOT2, EIF2S2, SRRM2, and PTMA are expected to be indirect targets of AKT1. These DPhospho peptides can be substrates of kinases/phosphatases deregulated upon *Akt1* depletion or of kinases/phosphatases that we could have missed in our MS data (Fig. 2). Notably, three of the four up-regulated DPhospho peptides, namely EIF2S2, SRRM2, and PTMA, make PPI with known kinases substrates of AKT1 that we did not identify in our MS experiment (Fig. 2, light orange edges). We thus make the testable hypothesis that their differential phosphorylation can be due to the action of these kinases.

Not surprisingly, multiple biological processes were impacted by *Akt1* depletion. We found significant enrichment signals for processes related to gene expression and protein production, metabolism, transport, and cell growth (Fig. 3). Regarding cell growth, by inhibiting phosphorylation of TSC2, AKT1 ensures mTORC1 activation (57, 58), which induces activation of S6K1/2 and inhibition of 4E-BP1 to stimulate both ribosome biogenesis and translation initiation (59). Interestingly, we found an up-regulation of TSC1 at the protein level but not at the transcript level, suggesting that *Akt1* depletion leads to increased translation/stability of the protein. It is known that TSC1 forms a heterodimeric complex with TSC2 (60), which is negatively regulated by 14-3-3beta after AKT1 phosphorylation (61) and finally degraded by the proteasome (62). We speculate that the increased TSC1 expression observed after *Akt1* depletion could mimic an in-

creased availability of TSC2 even if the protein was not detected in the MS experiment. More generally, the DEProts related to ribosome biogenesis, translation, and growth constitute novel candidate targets of the AKT1/TSC1,2/mTORC1/S6K1,2/4E-BP1 pathway. In sum, our proteomic approach in pGCs confirms the well-documented implication of AKT1 in the regulation of metabolism, cell cycle, survival/apoptosis (reviewed in (1)), actin cytoskeleton (22, 23) and DNA repair (63), and provides new links to be explored, namely, between AKT1 and intracellular transport or mitochondrial physiology.

On cell biology grounds, we found that the migration behavior of AT29C cells depleted for *Akt1* was different from that of control cells (Fig. 5). We noticed that *Akt1* depletion leads to a faster healing in scratch-wound assays, which is in line with several studies that have pinpointed the implication of Akt signaling in the regulation of processes controlling migration, actin cytoskeleton organization, cell-to-cell adhesion, or extracellular matrix remodeling. Indeed, several studies have documented an antimigration role for AKT1. One of them, performed in the human epithelial breast cancer cell line MCF-10, revealed that silencing of *Akt1* enhanced their migration (64). Similarly, the overexpression of activated AKT1 in another breast cancer cell line provoked reduced motility and invasion (65). However, AKT1 seems to have opposite effects depending on the cell type studied and/or whether the kinase is overexpressed in a constitutively active form or silenced (reviewed in (24, 66)). For instance, constitutively active AKT1 was shown to promote migration by activation of Girdin in kidney epithelial cells (22). The impact of AKT1 on migration may depend on the cell type and on the experimental conditions. For instance, in our insert removal experiment, we failed to detect any significant difference in the mean migration velocity between KD and control cells. However, in the very same experiment AT29C cells depleted for *Akt1* did show altered directional migration (Fig. 5). Indeed, by manually tracking individual cell migration, we found that *AKT1*-KD AT29C cells at the leading edge displayed a more random motility than the one of the control cells. Directional migration depends on the ability of the cell to polarize and reshape its cytoskeleton and its adhesion in response to intrinsic or extrinsic (environmental) regulation (67). In our MS data, some of the DEProts involved in focal adhesion and cytoskeleton regulation could explain the observed phenotype. Moreover, the PI3K/AKT pathway is known to positively regulate cell polarity (68, 69), and *Akt1* deficiency has been shown to reduce migration directionality in breast cancer cells (70). Our results thus confirm and extend previous observations.

In conclusion, this study maps the molecular effects of *Akt1* depletion at the protein and transcript levels in mouse granulosa cells. It confirms and extends the role of this kinase in critical cellular processes such directional migration. Our experimental and *in silico* analyses provide a series of new substrate candidates that deserve further investigation.

Gene Network Dependent on AKT1 in Murine Granulosa Cells

Acknowledgments—We thanks Dr A. Glentis for kind help with migration assays and Dr S. Caburet for her help with Cytoscape. We thank the CNRS' IMAGIF platform for the RNA-seq implementation.

DATA AVAILABILITY

The MS proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (43) partner repository with the dataset identifier PXD012548 as .raw files, Proteome Discoverer 2.1 .pdResult file, associated pep.xml and xlsx files, label-free report generated by Progenesis Q1. For RNA-sequencing results, data are available at Gene Expression Omnibus, accession number GSE130187.

* This work was supported by the University Paris-Diderot, by the Centre National de la Recherche Scientifique, by GEFLUC and from the Fondation pour la Recherche Médicale grant: [DEQ20150331757].

☐ This article contains supplemental material Tables S1–S8 and Figs. S1–S3.

✉ To whom correspondence may be addressed: Institut Jacques Monod. 15 rue Hélène Brion, 75013 Paris, France. Tel.: 33 6 03 51 67 46; E-mail: reiner.veitia@ijm.fr.

✉ To whom correspondence may be addressed: Institut Jacques Monod. 15 rue Hélène Brion, 75013 Paris, France. Tel.: 33 6 03 51 67 46; E-mail: anne-laure.todeschini@ijm.fr.

Author contributions: M.E., A.-L.T., and R.A.V. designed research; M.E., L.H., and B.L. performed research; M.E., L.H., B.L., T.L., and R.A.V. analyzed data; and M.E., A.-L.T., and R.A.V. wrote the paper.

REFERENCES

- Manning, B. D., and Cantley, L. C. (2007) AKT/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell* **129**, 1261–1274
- Cecconi, S., Mauro, A., Cellini, V., and Patacchiola, F. (2012) The role of Akt signalling in the mammalian ovary. *Int. J. Dev. Biol.* **56**, 809–817
- Dummler, B., and Hemmings, B. A. (2007) Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 231–235
- Gonzalez, E., and McGraw, T. E. (2009) The Akt kinases: Isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* **8**, 2502–2508
- Alessi, D. R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F. B., Morrice, N., Norman, D. G., Gaffney, P., Reese, C. B., MacDougall, C. N., Harbison, D., Ashworth, A., and Bownes, M. (1997) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): Structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr. Biol.* **7**, 776–789
- Sarbasov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098–1101
- Ersahin, T., Tuncbag, N., and Cetin-Atalay, R. (2015) The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol. Biosyst.* **11**, 1946–1954
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M. E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231–241
- Mayo, L. D., and Donner, D. B. (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 11598–11603
- Sunters, A., Fernández de Mattos, S., Stahl, M., Brosens, J. J., Zoumpoulidou, G., Saunders, C. A., Coffey, P. J., Medema, R. H., Coombes, R. C., and Lam, E. W.-F. (2003) FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* **278**, 49795–49805
- Gilley, J., Coffey, P. J., and Ham, J. (2003) FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J. Cell Biol.* **162**, 613–622
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857–868
- Du, K., and Montminy, M. (1998) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J. Biol. Chem.* **273**, 32377–32379
- Kane, L. P., Shapiro, V. S., Stokoe, D., and Weiss, A. (1999) Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr. Biol.* **9**, 601–604
- Shin, I., Yakes, F. M., Rojo, F., Shin, N.-Y., Bakin, A. V., Baselga, J., and Arteaga, C. L. (2002) PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat. Med.* **8**, 1145–1152
- Diehl, J. A., Cheng, M., Rousset, M. F., and Sherr, C. J. (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* **12**, 3499–3511
- Dibble, C. C., and Cantley, L. C. (2015) Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol.* **25**, 545–555
- Cong, L. N., Chen, H., Li, Y., Zhou, L., McGibbon, M. A., Taylor, S. I., and Quon, M. J. (1997) Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *Mol. Endocrinol.* **11**, 1881–1890
- Wang, Q., Somwar, R., Bilan, P. J., Liu, Z., Jin, J., Woodgett, J. R., and Klip, A. (1999) Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol. Cell Biol.* **19**, 4008–4018
- Beurel, E., Grieco, S. F., and Jope, R. S. (2015) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacol. Ther.* **148**, 114–131
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A. M. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**, 601–605
- Enomoto, A., Murakami, H., Asai, N., Morone, N., Watanabe, T., Kawai, K., Murakumo, Y., Usukura, J., Kaibuchi, K., and Takahashi, M. (2005) Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev. Cell* **9**, 389–402
- Vandermoere, F., El Yazidi-Belkoura, I., Demont, Y., Slomianny, C., Antol, J., Lemoine, J., and Hondermarck, H. (2007) Proteomics exploration reveals that actin is a signaling target of the kinase Akt. *Mol. Cell Proteomics* **6**, 114–124
- Xue, G., and Hemmings, B. A. (2013) PKB/Akt-dependent regulation of cell motility. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 393–404
- Kim, D., Kim, S., Koh, H., Yoon, S. O., Chung, A. S., Cho, K. S., and Chung, J. (2001) Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J.* **15**, 1953–1962
- Altomare, D. A., and Testa, J. R. (2005) Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* **24**, 7455–7464
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggins, G. J., Willson, J. K. V., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Velculescu, V. E. (2004) High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* **304**, 554
- Hyun, T., Yam, A., Pece, S., Xie, X., Zhang, J., Miki, T., Gutkind, J. S., and Li, W. (2000) Loss of PTEN expression leading to high Akt activation in human multiple myelomas. *Blood* **96**, 3560–3568
- Stemke-Hale, K., Gonzalez-Angulo, A. M., Lluch, A., Neve, R. M., Kuo, W.-L., Davies, M., Carey, M., Hu, Z., Guan, Y., Sahin, A., Symmans, W. F., Pusztai, L., Nolden, L. K., Horlings, H., Berns, K., Hung, M.-C., van de Vijver, M. J., Valero, V., Gray, J. W., Bernards, R., Mills, G. B., and Hennessy, B. T. (2008) An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res.* **68**, 6084–6091
- Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J. F., Wyczalkowski, M. A., Leiserson, M. D. M., Miller, C. A., Welch, J. S., Walter, M. J., Wendl, M. C., Ley, T. J., Wilson, R. K., Raphael, B. J., and Ding, L. (2013) Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **502**, 333–339
- Carpten, J. D., Faber, A. L., Horn, C., Donoho, G. P., Briggs, S. L., Robbins, C. M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T. Y., Savage, S., Uhlik, M., Lin, A., Du, J., Qian, Y.-W., Zeckner, D. J., Tucker-Kellogg, G., Touchman, J., Patel, K., Mousses, S., Bittner, M., Schevitz, R., Lai, M.-H. T., Blanchard, K. L., and Thomas, J. E. (2007) A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* **448**, 439–444
- Bessièrè, L., Todeschini, A.-L., Auguste, A., Sarnacki, S., Flatters, D., Legois, B., Sultan, C., Kalfa, N., Galmiche, L., and Veitia, R. A. (2015) A hot-spot of in-frame duplications activates the oncoprotein AKT1 in juvenile granulosa cell tumors. *EBioMedicine* **2**, 421–431
- Auguste, A., Bessièrè, L., Todeschini, A.-L., Caburet, S., Sarnacki, S., Prat, J., D'angelo, E., De La Grange, P., Ariste, O., Lemoine, F., Legois, B.,

Gene Network Dependent on AKT1 in Murine Granulosa Cells

- Sultan, C., Zider, A., Galmiche, L., Kalfa, N., and Veitia, R. A. (2015) Molecular analyses of juvenile granulosa cell tumors bearing AKT1 mutations provide insights into tumor biology and therapeutic leads. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 6687–6698
34. Brown, C., LaRocca, J., Pietruska, J., Ota, M., Anderson, L., Smith, S. D., Weston, P., Rasoulpour, T., and Hixon, M. L. (2010) Subfertility caused by altered follicular development and oocyte growth in female mice lacking PKB alpha/Akt1. *Biol. Reprod.* **82**, 246–256
35. Monniaux, D. (2016) Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. *Theriogenology* **86**, 41–53
36. Georges, A., L'Hôte, D., Todeschini, A. L., Auguste, A., Legois, B., Zider, A., and Veitia, R. A. (2014) The transcription factor FOXL2 mobilizes estrogen signaling to maintain the identity of ovarian granulosa cells. *eLife* **4**, 3
37. Dutertre, M., Gouédard, L., Xavier, F., Long, W. Q., di Clemente, N., Picard, J. Y., and Rey, R. (2001) Ovarian granulosa cell tumors express a functional membrane receptor for anti-Müllerian hormone in transgenic mice. *Endocrinology* **142**, 4040–4046
38. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. (2012) Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682
39. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003) Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504
40. Gavard, J., Lambert, M., Grosheva, I., Marthiens, V., Irinopoulou, T., Riou, J.-F., Bershadsky, A., and Mège, R.-M. (2004) Lamellipodium extension and cadherin adhesion: Two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways. *J. Cell Sci.* **117**, 257–270
41. Ganz, A., Lambert, M., Saez, A., Silberzant, P., Buguin, A., Mège, R. M., and Ladoux, B. (2006) Traction forces exerted through N-cadherin contacts. *Biol. Cell* **98**, 721–730
42. Taus, T., Köcher, T., Pichler, P., Paschke, C., Schmidt, A., Henrich, C., and Mechtler, K. (2011) Universal and confident phosphorylation site localization using phosphoRS. *J. Proteome Res.* **10**, 5354–5362
43. Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D. J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., Pérez, E., Uszkoreit, J., Pfeuffer, J., Sachsenberg, T., Yilmaz, S., Tiwary, S., Cox, J., Audain, E., Walzer, M., Jarnuczak, A. F., Ternent, T., Brazma, A., and Vizcaino, J. A. (2019) The PRIDE database and related tools and resources in 2019: Improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* **47**, D442–D450
44. Soper, D. S. (2019) Significance of the Difference between Two Slopes Calculator [Software]. Available from <http://www.danielsoper.com/statcalc>
45. Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., Stein, T. I., Nudel, R., Lieder, I., Mazor, Y., Kaplan, S., Dahary, D., Warshawsky, D., Guan-Golan, Y., Kohn, A., Rappaport, N., Safran, M., and Lancet, D. (2016) The GeneCards Suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses. *Curr. Protoc. Bioinformatics* **54**, 1.30.1–1.30.33
46. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., and Mesirov, J. P. (2005) Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 15545–15550
47. Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K.-F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson, N., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., Altshuler, D., and Groop, L. C. (2003) PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* **34**, 267–273
48. Gao, F., Zhang, J., Wang, X., Yang, J., Chen, D., Huff, V., and Liu, Y.-X. (2014) Wt1 functions in ovarian follicle development by regulating granulosa cell differentiation. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 333–341
49. Kusaka, M., Katoh-Fukui, Y., Ogawa, H., Miyabayashi, K., Baba, T., Shima, Y., Sugiyama, N., Sugimoto, Y., Okuno, Y., Kodama, R., Iizuka-Kogo, A., Senda, T., Sasaoka, T., Kitamura, K., Aizawa, S., and Morohashi, K. (2010) Abnormal epithelial cell polarity and ectopic epidermal growth factor receptor (EGFR) expression induced in Emx2 KO embryonic gonads. *Endocrinology* **151**, 5893–5904
50. Efimenko, E., Padua, M. B., Manuylov, N. L., Fox, S. C., Morse, D. A., and Tevosian, S. G. (2013) The transcription factor GATA4 is required for follicular development and normal ovarian function. *Dev. Biol.* **381**, 144–158
51. Tang, X., Xu, S., Li, R., Zhang, H., Chen, Q., Wu, W., and Liu, H. (2016) Polycomb repressive complex 1 (PRC1) regulates meiotic initiation of ovarian germ cells in chick embryos. *Mol. Cell. Endocrinol.* **437**, 171–182
52. Hu, X., Roberts, J. R., Apopa, P. L., Kan, Y. W., and Ma, Q. (2006) Accelerated ovarian failure induced by 4-vinyl cyclohexene diepoxide in Nrf2 null mice. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 940–954
53. Le Masson, F., Razak, Z., Kaigo, M., Audouard, C., Charry, C., Cooke, H., Westwood, J. T., and Christians, E. S. (2011) Identification of heat shock factor 1 molecular and cellular targets during embryonic and adult female meiosis. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 3410–3423
54. Tuna, M., Chavez-Reyes, A., and Tari, A. M. (2005) HER2/neu increases the expression of Wilms' tumor 1 (WT1) protein to stimulate S-phase proliferation and inhibit apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* **24**, 1648–1652
55. Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., Mills, G. B., Kobayashi, R., Hunter, T., and Lu, Z. (2007) Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **282**, 11221–11229
56. Robitaille, A. M., Christen, S., Shimobayashi, M., Cornu, M., Fava, L. L., Moes, S., Prescianotto-Baschong, C., Sauer, U., Jenoe, P., and Hall, M. N. (2013) Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis. *Science* **339**, 1320–1323
57. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.-L. (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* **4**, 648–657
58. Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., Carr, S. A., and Sabatini, D. M. (2007) PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol. Cell* **25**, 903–915
59. Iadevaia, V., Liu, R., and Proud, C. G. (2014) mTORC1 signaling controls multiple steps in ribosome biogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **36**, 113–120
60. van Slegtenhorst, M., Nellist, M., Nagelkerken, B., Cheadle, J., Snell, R., van den Ouweland, A., Reuser, A., Sampson, J., Halley, D., and van der Sluijs, P. (1998) Interaction between hamartin and tuberlin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1053–1057
61. Li, Y., Inoki, K., Yeung, R., and Guan, K.-L. (2002) Regulation of TSC2 by 14–3–3 binding. *J. Biol. Chem.* **277**, 44593–44596
62. Plas, D. R., and Thompson, C. B. (2003) Akt activation promotes degradation of tuberlin and FOXO3a via the proteasome. *J. Biol. Chem.* **278**, 12361–12366
63. Mueck, K., Rebholz, S., Harati, M. D., Rodemann, H. P., and Toulany, M. (2017) Akt1 stimulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks in a Rad51-dependent manner. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, E2473
64. Irie, H. Y., Pearlman, R. V., Grueneberg, D., Hsia, M., Ravichandran, P., Kothari, N., Natesan, S., and Brugge, J. S. (2005) Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* **171**, 1023–1034
65. Liu, H., Radisky, D. C., Nelson, C. M., Zhang, H., Fata, J. E., Roth, R. A., and Bissell, M. J. (2006) Mechanism of Akt1 inhibition of breast cancer cell invasion reveals a protumorigenic role for TSC2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 4134–4139
66. Chin, Y. R., and Toker, A. (2009) Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell. Signal.* **21**, 470–476
67. Petrie, R. J., Doyle, A. D., and Yamada, K. M. (2009) Random versus directionally persistent cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 538–549
68. Chung, C. Y., Potikyan, G., and Firtel, R. A. (2001) Control of cell polarity and chemotaxis by Akt/PKB and PI3 kinase through the regulation of PAKa. *Mol. Cell* **7**, 937–947
69. Onishi, K., Higuchi, M., Asakura, T., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2007) The PI3K-Akt pathway promotes microtubule stabilization in migrating fibroblasts. *Genes Cells* **12**, 535–546
70. Ju, X., Katiyar, S., Wang, C., Liu, M., Jiao, X., Li, S., Zhou, J., Turner, J., Lisanti, M. P., Russell, R. G., Mueller, S. C., Ojefo, J., Chen, W. S., Hay, N., and Pestell, R. G. (2007) Akt1 governs breast cancer progression in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 7438–7443

AQ: P