

COMMUNICATION

Le facteur de transcription FOXL2 : un acteur clé de la différenciation de l'ovaire, de son maintien et de la fertilité

MOTS-CLÉS : FACTEURS DE TRANSCRIPTION. OVAIRE. TRANSDIFFÉRENCIATION CELLULAIRE

The transcription factor FOXL2: a key player of ovarian differentiation, maintenance and fertility

KEYWORDS: TRANSCRIPTION FACTORS. OVARY. CELL TRANSDIFFERENTIATION

Reiner A. VEITIA *

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt en relation avec le contenu de cet article.

RÉSUMÉ

La détermination du sexe gonadique implique la décision de faire un testicule ou un ovaire à partir d'une ébauche indifférenciée et bipotentielle. Chez les mammifères, la détermination gonadique a longtemps été assimilée à la détermination du testicule, alors que l'ovaire se développerait par défaut en l'absence du facteur de détermination testiculaire. Nombre de résultats nuancent ce point de vue et montrent que des mécanismes actifs sont nécessaires au maintien de l'état différencié de l'ovaire et que les gènes 'testiculaires' y sont constamment réprimés. Un acteur majeur de ce processus est FOXL2, un facteur de transcription, dont les mutations connues dans l'espèce humaine sont associées à des anomalies palpébrales et à une infertilité féminine. FOXL2 murin en synergie avec le récepteur alpha de l'estradiol (ESR1) empêche la transdifférenciation des cellules de soutien en cellules de type testiculaire dans l'ovaire adulte. FOXL2 est également requis pour l'expression de l'aromatase, l'enzyme clé de la production d'estradiol, et module l'expression de son récepteur beta (ESR2), avec qui il réprime l'expression du gène de détermination testiculaire Sox9. Ceci suggère l'existence d'une boucle d'anticipation cohérente (feed-forward) selon laquelle

* Membre correspondant de l'Académie nationale de médecine. Institut Jacques Monod, Bâtiment Buffon, 15 Rue Hélène Brion, Paris Cedex 13, France ; Université Paris Diderot, Paris 7, Paris, France ; e-mail : reiner.veitia@ijm.fr. Lauréat du prix Jacques Salat-Baroux 2010.

Tirés à part : Professeur Reiner A. VEITIA, même adresse.

Article reçu le 4 décembre 2015, accepté le 23 mai 2016

FOXL2 stimule la production d'estradiol et sa réceptivité (ESR2) afin de réprimer efficacement Sox9 dans l'ovaire. Par ailleurs, l'inactivation ciblée de FOXL2 chez la chèvre conduit à une inversion sexuelle (mâle XX) in utero. FOXL2 est donc important dès les premiers stades du développement de l'ovaire fœtal caprin et est requis pour son maintien postnatal chez la souris. Il reste à comprendre les bases de ces différences et surtout son rôle dans l'ovaire humain. Les technologies de nouvelle génération permettront de répondre à ces questions et à bien d'autres.

SUMMARY

Gonadal sex determination involves a decision of making a testis or an ovary from an undifferentiated and bipotential primordium. In mammals, gonadal determination has long been equated to testis determination, and the ovary was thought to develop by default in the absence of the testis determining factor. Many results nuance this view and indicate that active mechanisms are required to maintain the ovarian identity and that " testicular genes " are suppressed continuously. A major player in this process is FOXL2, a transcription factor, whose known mutations in humans are associated with eyelid abnormalities and female infertility. Murine FOXL2 in synergy with the estradiol receptor alpha (ESR1) precludes transdifferentiation of supporting cells into testis-like cells in the adult ovary. FOXL2 is also required for the expression of aromatase, a key enzyme of estradiol production and modulates the expression of estrogen receptor beta (ESR2) with which it co-represses Sox9, a testis determining gene. This suggests the existence of a coherent feedforward loop in which FOXL2 stimulates estradiol production and receptivity (ESR2) to effectively repress Sox9 in the ovary. Moreover, targeted mutation of FOXL2 in the goat leads to sex reversal (XX male) in utero. FOXL2 is thus important for the development of goat fetal ovary and is required for its postnatal maintenance in mice. The bases of these differences and especially their role in the human ovary remain to be explored. The power of new generation technologies will help answer these and other open questions.

INTRODUCTION

La détermination du sexe gonadique est un processus impliquant la décision de faire un testicule ou un ovaire à partir d'une ébauche embryonnaire indifférenciée et bipotentielle. La gonade bipotentielle comprend les cellules germinales d'origine extra-embryonnaire, et trois types de cellules somatiques. La composante somatique inclut les précurseurs des cellules de soutien, qui donneront lieu aux cellules de Sertoli dans le testicule ou aux cellules de la granulosa dans l'ovaire, les précurseurs des cellules stéroïdogènes qui se différencient en cellules de Leydig chez le mâle et cellules de la thèque chez la femelle et, enfin, les cellules du tissu conjonctif [1]. Les perturbations du développement gonadique peuvent aboutir à des troubles du développement sexuel (*Disorders of Sex Development* ou *DSD*) constituant un problème de santé publique. Certains DSD peuvent être dépistés lors des échographies anténatales et nécessitent une prise en charge périnatale. Les DSDs regroupent des pathologies variées comme les dysgénésies gonadiques, l'infertilité, et les néoplasies gonadiques [2]. Les DSD peuvent engendrer des difficultés identitaires ou

à concevoir un enfant. Ainsi, comprendre le développement et la fonction de la gonade en conditions normales et pathologiques est un enjeu majeur de recherche et de conseil génétique.

D'un point de vue génétique, le gène *SRY* est essentiel au démarrage de la cascade de détermination testiculaire [3]. Chez l'Homme, *SRY* est exprimé à partir de la période de détermination testiculaire jusqu'à l'âge adulte [4]. Le rôle principal de *SRY* en tant que facteur de transcription (FT) serait d'activer directement l'expression du gène *SOX9*, qui code pour un FT de la même famille que *SRY* (i.e. contenant une boîte HMG/*High Mobility Group* de liaison à l'ADN, Figure 1A). D'autres membres de la famille pourraient être impliqués dans, ou interférer avec, la détermination testiculaire. Par exemple, chez la souris *Sox8* semble renforcer l'action de *Sox9*. Ainsi, leur inactivation combinée a un effet plus important que leur invalidation simple [5].

Sry murin exercerait son action sur *Sox9* via un élément de régulation en *cis* appelé *TESCO* (pour *testis-specific enhancer of Sox9 (TES) core*) [6]. Chez l'Homme, une région régulatrice nommée *RevSex*, d'environ 40 kb et située à 600 kb en amont de *SOX9*, a été cartographiée. Elle contiendrait deux *enhancers* et plusieurs sites de fixation pour les FTs *SRY*, *SF1*, *WT1*, *SOX9* et *DMRT1* [7]. Chez la souris, *SRY* coopère avec le facteur stéroïdogène 1 (*SF1*) pour se lier à *TESCO* et activer l'expression de *Sox9* (Figure 1A). Ensuite, *SF1* et *SOX9* lui-même maintiennent l'expression de ce dernier, en l'absence de *SRY*, créant ainsi une boucle de rétroaction positive. L'expression de *SOX9* une fois déclenchée, est également soutenue par d'autres boucles de rétroaction positive impliquant *FGF9* [8] et la prostaglandine D synthase et son produit, la *PGD2* [9]. Ces circuits redondants amplifiant l'expression et/ou l'activité de *SOX9* sont nécessaires au maintien de l'état testiculaire différencié et apporterait de la robustesse au système. Comme attendu, la surexpression de *SOX9* dans un fonds génétique XX est associée à la formation de testicules, comme dans le cas d'un patient possédant une duplication impliquant *SOX9* [10] ou de la mutation *Odsex* chez la souris, où un transgène inséré dans une région régulatrice dérèprime l'expression de *Sox9* [11]. *SOX9* est donc un effecteur majeur de la détermination testiculaire chez les vertébrés, et dans l'évolution, *SRY* n'aurait été recruté que récemment à la tête de la cascade génétique.

Avant de clore cette section, et sans la prétention d'être exhaustif, il est intéressant de mentionner les délétions du bras court du chromosome 9 humain qui aboutissent à des anomalies de la formation des testicules chez 3/4 des patients XY [12]. Ces délétions touchent le gène *DMRT1*, dont on reparlera, et ses deux paralogues *DMRT2* et *3*. Un homologue de *DMRT1* ayant été impliqué dans le développement gonadique chez le ver *C. elegans* et chez certain insectes [13], il a été un candidat parfait pour des DSD 46,XY pendant des années. Cependant, c'est seulement récemment qu'une mutation ponctuelle de *DMRT1* décrite chez un cas de DSD 46,XY (femme XY) a pu l'incriminer formellement [14]. La forme mutée de *DMRT1* agirait comme un dominant négatif perturbant la stoechiométrie de fixation du FT normal sur ses cibles [14], mais comme l'attestent les délétions

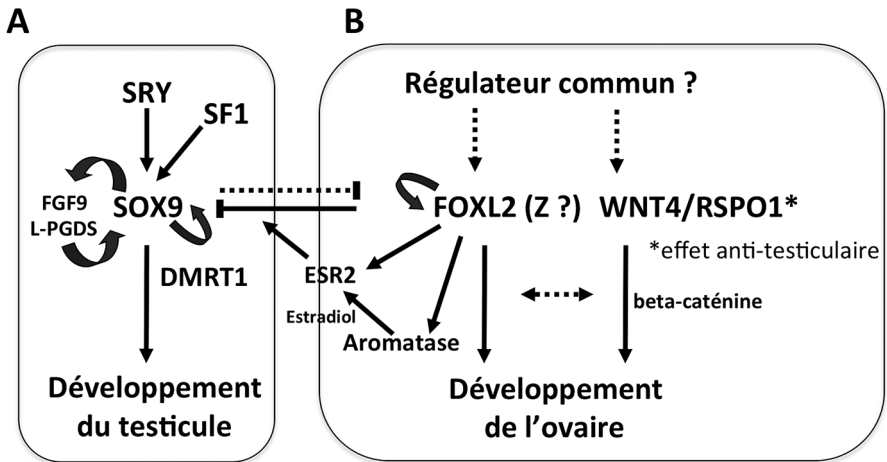


FIG. 1. — Diagramme simplifié des interactions moléculaires au cours de la détermination/différenciation des gonades (modifié d'après la réf. 42). Les flèches pleines représentent des interactions bien documentées, les flèches discontinues représentent les interactions supposées. Les interactions entre FOXL2 et SOX9 sont représentées comme un interrupteur à bascule. L'expression de l'un d'eux entraîne la répression de l'autre et vice-versa. Ce processus est consolidé par des boucles de rétroaction positive. La répression de *Sox9* par FOXL2 est maintenant claire, le contraire reste à démontrer, mais est hautement probable. Y a-t-il un régulateur qui orchestrerait le développement de l'ovaire ? Des données actuelles suggèrent que FOXL2 pourrait être le facteur Z, dont l'absence conduirait au développement des testicules.

hétérozygotes du 9p, une seule copie du gène n'est pas suffisante pour assurer un développement testiculaire normal. Ainsi, l'haploinsuffisance de DMRT1 pourrait également expliquer la dominance du phénotype.

Chez les mammifères, la détermination du sexe est assimilée à la détermination du testicule, alors que la détermination de l'ovaire a été longtemps considérée comme un processus par défaut. Ainsi, l'absence du facteur de détermination testiculaire conduirait « spontanément » à la formation d'un ovaire. Un certain nombre de résultats remettent en question ce point de vue et montrent que des mécanismes actifs sont bien nécessaires pour initier et maintenir l'état différencié de l'ovaire et que les gènes « testiculaires » y sont réprimés constamment depuis le stade embryonnaire jusqu'à l'âge adulte [15-19], de même que les gènes « ovariens » doivent être réprimés dans le testicule embryonnaire et adulte [20].

FOXL2 : un facteur de transcription clé pour la différenciation ovarienne.

Chez la plupart des mammifères, l'ovaire commence à s'organiser dès sa différenciation et avant l'entrée en méiose des cellules germinales. Cette phase précoce est marquée par la mise en place du cortex et de la médulla. Le cortex est enrichi en

cellules germinales alors que la médulla est composée essentiellement de cellules somatiques. Cette phase de morphogenèse précoce dure plusieurs semaines chez la femme, alors qu'elle se cantonne à une journée (12.5-13.5 jpc) chez la souris [21]. Une perturbation de ces processus peut conduire à l'apparition de testicules chez un individu XX sans *SRY*, comme il a été rapporté chez l'Homme et chez différents animaux domestiques. Le premier locus impliqué dans l'inversion sexuelle XX a été cartographié grâce à l'étude d'un syndrome d'intersexualité caprine (PIS pour *polled intersex syndrome*) [22]. Ce syndrome comporte une absence dominante de cornes qui touche les deux sexes ainsi qu'une inversion sexuelle XX autosomique récessive. Le locus PIS (en 1q43) est synténique avec le locus humain dont les mutations sont responsables du syndrome du Blépharophimosis (*Blépharophimosis ptosis épicanthus inversus syndrome*/BPES, en 3q23). Le BPES comprend une malformation craniofaciale associée dans la majorité des cas à une insuffisance ovarienne prématurée (IOP, BPES de type I) ou isolée (BPES de type II) [23]. L'IOP est une perte de la fonction ovarienne avant l'âge de 40 ans. Elle peut survenir dès la période péripubertaire ou plus tardivement, et atteint entre 1 à 3 % des femmes avant 40 ans [24].

Le BPES résulte de mutations du gène *FOXL2* qui code pour un FT à domaine *forkhead* [25]. La recherche de mutations dans la région codante de *FOXL2* chez les malades BPES a permis de trouver des mutations à l'état hétérozygote dans 3/4 des cas étudiés. Plus de 30 % des mutations intragéniques correspondent à des duplications entraînant une expansion du domaine PolyAlanine, réduisant ou abolissant la mobilité intranucléaire de *FOXL2* [26]. Nous avons également montré l'existence d'une mutation ponctuelle affectant son activité, dans un cas d'IOP sans BPES [27]. Dans le but d'établir une corrélation entre le type de mutation de *FOXL2* et la présence d'IOP, nous avons étudié les effets fonctionnels de dizaines de formes mutantes responsables de BPES de type I (avec IOP) ou II (sans IOP). Nos analyses ont montré que les protéines mutantes conduisant à un BPES de type I sont dépourvues d'activité transcriptionnelle sur les rapporteurs testés, alors que celles responsables d'un BPES de type II la conservent [28]. Nous avons ensuite modélisé la structure du domaine *forkhead* par comparaison avec les données cristallographiques disponibles pour d'autres facteurs. Lorsque les mutations touchant les chaînes latérales des acides aminés impliqués dans les alpha-hélices du *forkhead* sont orientées vers le cœur hydrophobe formé par ces hélices, une perte de fonction est observée ou attendue. Au contraire, si les chaînes latérales altérées pointent vers l'extérieur du cœur hydrophobe, la fonction de *FOXL2* sera préservée dans l'ovaire. La disposition spatiale des chaînes en question est disponible dans un tableau de la réf. [29]. Ceci permet de prédire l'impact sur la fonction ovarienne des mutations dans le domaine *forkhead* et ainsi faciliter le conseil génétique aux familles des fillettes prépubères avec BPES. Nos études moléculaires nous ont permis de montrer que l'activité de *FOXL2* est réprimée par l'histone déacétylase SIRT1. De façon cohérente, la nicotinamide, une vitamine inhibitrice des SIRTuines, augmente les niveaux d'activité de *FOXL2*, autant *in vitro* que *in vivo* [30]. Cela pourrait ouvrir la

voie au développement de stratégies thérapeutiques ciblées pour traiter certains cas d'IOP associée au BPES.

Deux modèles murins invalidés (knock-out/KO) pour *Foxl2* sont cohérents avec ce que l'on a constaté chez l'humain. En effet, les souris XX dépourvus de *Foxl2* n'ont pas de paupières et sont phénotypiquement femelles et stériles [31, 32]. Tout juste après la naissance, les souris KO ont un nombre apparemment normal d'ovocytes mais un arrêt de la maturation folliculaire conduit à une atrésie massive [31, 32]. Cependant, malgré son expression précoce, *FoxL2* n'est pas impliqué dans la détermination du sexe primaire chez la souris et les animaux XX KO ne présentent pas d'inversion de sexe.

Alors que les mutations connues de *FOXL2* humain sont associées à une IOP et non à un DSD 46, XX (testiculaire), chez la chèvre, la mutation PIS aboutit à une inversion de sexe des fœtus XX homozygotes mutants (*PIS*^{-/-}). La mutation PIS consiste en une délétion de 11,7 kb qui conduit à la dérégulation de plusieurs gènes dans la région génomique. Notamment, l'expression de *FOXL2* est abolie dans les gonades XX *PIS*^{-/-} et il constitue un candidat idéal pour expliquer l'inversion sexuelle [22]. L'utilisation de nucléases à doigts de zinc créant des mutations « perte de fonction » a permis de vérifier cette hypothèse [19]. Plusieurs fœtus mutés ont été obtenus, dont un fœtus XX qui possédait des mutations dans les deux allèles de *FOXL2*. Ce fœtus présentait, en plus d'une absence de paupières, une masculinisation des organes génitaux internes et externes [19]. Ses gonades étaient différenciées en testicules. Des résultats d'analyses transcriptomiques ont révélé que parmi les 163 gènes dérégulés dans la gonade XX *PIS*^{-/-} (intersexuée, n'exprimant pas *FOXL2*), 15 % seraient des gènes activés par *FOXL2*, et 85 % seraient inhibés par lui dans l'ovaire normal. *FOXL2* active donc des gènes ovariens, mais il est surtout un facteur anti-testiculaire, maintenant ainsi l'identité ovarienne. De façon inattendue, chez les animaux XX *PIS*^{-/-}, *DMRT1* est surexprimé avant *SOX9* dans les cellules de soutien et serait à l'origine de leur masculinisation [33]. Il est à noter que nous avons recherché des mutations dans la région codante de *FOXL2* chez 23 mâles XX mais seuls deux variants, également présents chez des parents non affectés ont été trouvés [34]. Ces résultats suggèrent que les mutations dans la région codante de *FOXL2* jouent un rôle mineur, voire aucun, dans cette pathologie. Cependant, nous n'excluons pas l'existence de mutations régulatrices affectant spécifiquement l'expression ovarienne de *FOXL2*, qui peuvent être aisément recherchées aujourd'hui grâce aux progrès des technologies de séquençage génomique.

D'autres gènes, comme ceux codant les molécules de signalisation *WNT4* et *RSPO1* sont également cruciaux pour le développement et la fonction de l'ovaire [35, 36] (Figure 1B). Ainsi, les souris femelles dépourvues de *Wnt4* sont masculinisées et la surexpression de ce gène chez un homme portant une duplication de 1p31-p35 serait responsable d'une féminisation (46,XY DSD [37]). De même, les souris XX dépourvues de *Rspo1* présentent une inversion de sexe à la naissance et des mutations abolissant l'expression de *RSPO1* chez l'humain sont la cause d'un syndrome caractérisé par un 46,XX DSD testiculaire [36, 38]. *WNT4* et *RSPO1* contribuent à

stabiliser la bêta-caténine, dont l'expression ectopique d'une forme stable peut conduire au développement d'ovaires chez des souris XY [39], même si un rôle non canonique pour WNT4 ne peut pas être exclu. Malgré l'absence d'inversion sexuelle chez les souris XX dépourvues de FOXL2, elles montrent une hausse de l'expression gonadique de SOX9 après la naissance [40]. L'analyse poussée des modèles animaux a montré que les cellules de la granulosa des souris dépourvues de *Rspo1*, de *Wnt4*, ou à la fois de *FoxL2* et *Rspo1* ou *Wnt4*, acquièrent des caractéristiques de cellules de Sertoli, associées à une forte expression anténatale de SOX9 et d'autres gènes de la différenciation testiculaire [15, 41]. Ainsi, la dérégulation d'un sous-ensemble critique de gènes prédisposerait à un 'changement de sexe moléculaire'.

FOXL2 : un facteur clé de l'identité de l'ovaire

Uhlenhaut et al. [16] ont montré que FOXL2 est nécessaire pour empêcher la transdifférenciation des cellules de la granulosa de l'ovaire adulte de souris en cellules de type Sertoli. En effet, 3 semaines après l'induction de la délétion de *Foxl2*, les structures folliculaires prennent l'aspect de 'tubes' séminifères. Dans la plupart de ces structures, les ovocytes ont disparu et les cellules de la granulosa ont acquis les caractéristiques morphologiques des cellules de Sertoli. Des analyses transcriptomiques ont montré l'augmentation de l'expression de marqueurs de cellules de Sertoli (*Sox9*, *Gata1*, *Dax1*, *Dhh*, *Dmrt1*) et de Leydig (*Hsd17b3*). Force est de constater que la seule perte de *Foxl2* est suffisante pour induire la transdifférenciation de cellules ovariennes en cellules de type testiculaire chez l'adulte. Ainsi, la disparition de FOXL2 laisse la place à l'expression de SOX9, moyennant une période d'un jour dans laquelle ni l'un ni l'autre ne sont détectables, ce qui suggère que ces facteurs sont mutuellement exclusifs. L'exclusion entre SOX9 et FOXL2 nous rappelle un interrupteur à bascule dans lequel deux gènes maîtres s'inhibent l'un l'autre, conduisant à deux états alternatifs (testicule ou ovaire) (Figure 1) [42]. L'augmentation rapide de l'expression de SOX9 dans les gonades adultes sans FOXL2 suggère une répression directe de SOX9 par FOXL2. En effet, FOXL2 semble reconnaître directement TESCO *in vivo* et inhiber l'activation de ce dernier par SRY/SF1 et SOX9/SF1 *in vitro* [16]. Ceci est cohérent avec le fait que la surexpression de FOXL2 dans des cellules de Sertoli XY chez des souris transgéniques conduit à la désorganisation des tubes séminifères et au développement de structures ovo-testiculaires [41]. Des cellules semblables à des Sertoli, exprimant *Sox9* dans des ovaires murins après la naissance, apparaissent aussi chez la souris invalidée pour les gènes codant les récepteurs des estrogènes (*Esr1/ER alpha* et *Esr2/ER beta*, [43]). De façon cohérente, des expériences *in vitro* suggèrent que FOXL2 en synergie avec ESR1 serait capable de réprimer TESCO [16]. Nous avons identifié un site de haute affinité pour FOXL2 par *DNA-selex*. Ce site, appelé *FOXL2 Responsive Element* ou FLRE, diffère des sites reconnus par d'autres FTs à domaine *forkhead* et ressemble au consensus reconnu par les récepteurs des estrogènes (ou ERE pour *estrogen response element*) [44, 45]. La divergence du FLRE par

rapport au site consensus « *forkhead* » est de mise au moins dans le contexte du développement des gonades afin d'empêcher une différenciation ovarienne intempestive chez un individu XY déclenchée par d'autres FTs à *forkhead*. Sans surprise, la délétion des sites consensus *forkhead* standards dans TESCO n'abolit pas l'action de FOXL2/ESR1 alors que la mutation des deux sites FLRE/ERE classiques le fait [16].

Des études à haut débit sur des cellules de la granulosa de souris adultes cultivées *ex vivo* nous ont permis de montrer que FOXL2 module directement l'expression de *ESR2* à travers un élément intronique. De plus, nous avons montré que *ESR2* est le vecteur principal de la signalisation de l'estradiol dans ces cellules et non pas *ESR1*. Pour mieux comprendre l'effet combiné de FOXL2 et *ESR2* sur l'état de différenciation des cellules de la granulosa, nous avons analysé l'expression de *SOX9* après le *knock-down* de *Foxl2* et/ou *Esr2*. Nous avons constaté une hausse de l'expression de *Sox9* en l'absence de l'un ou de l'autre, qui est devenue synergique en l'absence des deux. Cela montre que *ESR2* et FOXL2 co-répriment *Sox9*. Nos analyses transcriptomiques ont confirmé que FOXL2 est requis pour l'expression de *CYP19A1* (codant l'aromatase) à la fois en présence et en l'absence d'estradiol. Ces données suggèrent l'existence d'une boucle d'anticipation cohérente (*positive feed-forward*) selon laquelle FOXL2 stimule la production d'estradiol via l'aromatase et sa réceptivité via le contrôle de l'expression d'*ESR2*. Cette boucle serait responsable, au moins en partie, du maintien de l'identité des cellules de la granulosa adultes par répression de *Sox9* [46] (Figure 2). De plus, nous n'avons pu détecter la liaison ni de FOXL2 ni d'*ESR1* à TESCO dans nos cellules, alors que la capacité de FOXL2 et des estrogènes à réprimer *Sox9* était bien présente. Par conséquent, cette répression passerait à la fois par *ESR2* (et l'estradiol) et par une voie indépendante.

Questions et hypothèses

Après la détermination des gonades, leur identité doit être maintenue, ce qui doit impliquer des boucles de rétroaction positives agissant sur les gènes essentiels au maintien de l'état différencié. Ceci est clairement le cas pour *SOX9*. Tel pourrait être également le cas de FOXL2, capable d'activer son propre promoteur, au moins *in vitro* [26]. En aval de ces boucles de rétroaction, l'état différencié peut être maintenu: i) en exprimant une série d'activateurs en réponse aux régulateurs maîtres (p. ex. FOXL2/WNT4/RSP01 ou *SOX9*/DMRT1), qui définiront à leur tour l'ensemble des gènes à exprimer, ii) en exprimant une série des répresseurs qui définiront 'par exclusion' le répertoire de gènes exprimés ou, iii) plus probablement, une combinaison de ces deux mécanismes. L'absence à la fois de FOXL2 et de *SOX9* pendant la journée précédant la transdifférenciation dans l'expérience d'Uhlenhaut et *al.* soulève une question intéressante : le processus de transdifférenciation comporte-t-il une étape de dédifférenciation, conduisant à un état bipotentiel, suivie par une redifférenciation? Ou bien, s'agit-il du temps nécessaire à la synthèse de nouvelles protéines et dégradation des anciennes ? Quelle qu'en soit la réponse, ce phénomène est compatible avec l'idée d'un interrupteur à bascule avec deux états: expression de

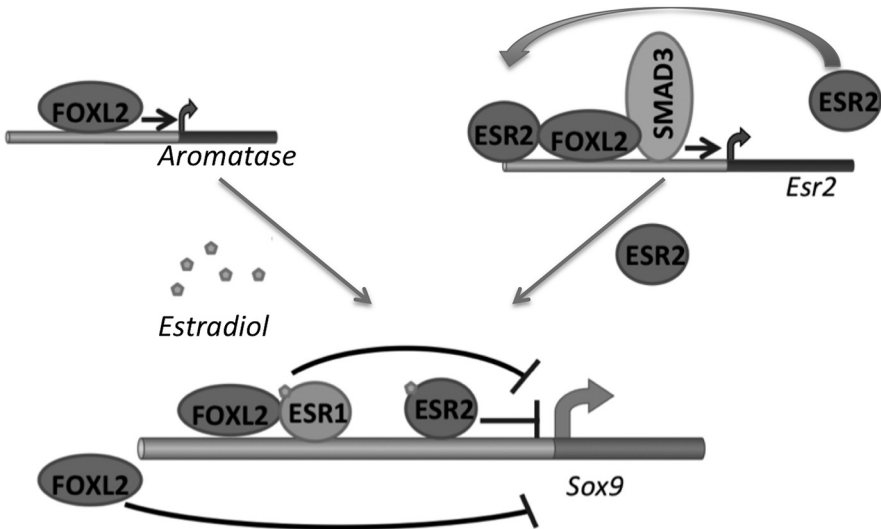


FIG. 2. — Diagramme simplifié montrant comment FOXL2 pourrait maintenir l'identité de l'ovaire. FOXL2 stimule la production d'estradiol via l'activation du gène de l'aromatase (codant l'enzyme qui convertit les androgènes en estradiol). FOXL2 stimule aussi la production du récepteur beta de l'estradiol (ESR2) qui est aussi dépendante de SMAD3 [46]. Ensemble, FOXL2 et ESR1 et 2, activés par l'estradiol, réprimerait directe et/ou indirectement l'expression de Sox9 dans l'ovaire et, ainsi, le 'programme testiculaire'.

FOXL2 ou expression de SOX9 [42]. La rapidité du processus de transdifférenciation est remarquable. Le paradigme épigénétique actuel pour expliquer comment un génome donne lieu à une grande variété de cellules est basé sur l'hétérochromatinisation facultative. Cet état chromatinien est souvent associé à la méthylation de l'ADN et des modifications des histones. Dans le cas présent, le processus semble avoir une dynamique plus rapide que la dilution passive des marques répressives de l'ADN. Une telle dynamique pourrait résulter d'un interrupteur à bascule régulant l'expression et/ou le recrutement d'enzymes capables de changer rapidement les marques de la chromatine et sa conformation (i.e. ouverture ou fermeture). Les travaux discutés ci-dessus suggèrent que FOXL2 pourrait être le facteur Z, un répresseur de la voie testiculaire postulé à partir d'études réalisées chez l'Homme [47]. L'absence de Z conduirait au développement des testicules et dans des conditions pathologiques cela expliquerait l'apparition de testicules chez un individu XX (Figure 1). Pour étayer davantage cette idée, il serait intéressant d'évaluer si l'expression de FOXL2 dans le testicule est réprimée directement ou indirectement par SRY, SOX9 ou DMRT1. Si cela s'avère être le cas, alors FOXL2 devient le meilleur candidat connu à ce jour pour être le facteur Z.

CONCLUSION

Une quantité croissante de travaux montrent que le développement de l'ovaire et son maintien ne sont pas des processus passifs [15-17, 19, 46]. Les résultats portant en particulier sur *FOXL2* montrent qu'il est crucial pour la détermination/différenciation de l'ovaire caprin, alors que chez la souris l'effet de son absence ne se fait sentir qu'à partir de la naissance. Il serait intéressant de comprendre les bases moléculaires et cellulaires de ces différences. Par ailleurs, les travaux discutés n'excluent pas que *FOXL2* joue aussi un rôle de maintien ovarien chez la chèvre adulte. Et qu'en est-il de son rôle chez la femme?

Les deux formes majeures du récepteur aux estrogènes, ESR1 et ESR2 sont exprimées dans l'ovaire, cependant ESR2 est prédominant dans les cellules de la granulosa. Par conséquent, il serait intéressant d'étudier les interactions entre ESR2 et *FOXL2* sur *TESCO* ou *RevSex* de la même manière que rapporté pour ESR1. Un autre aspect moléculaire intéressant qui reste encore à définir concerne la nature des sites de liaison pour le complexe ESR-*FOXL2* et leur rapport avec le FLRE.

Enfin, et compte tenu de l'indépendance apparente des voies WNT/RSP01 et *FOXL2*, il serait intéressant de modifier conditionnellement la voie bêta-caténine dans des ovaires adultes afin d'explorer si les cellules folliculaires se transdifférencient et de tester si la signalisation WNT/RSP01 est également nécessaire pour réprimer l'expression des gènes testiculaires dans l'ovaire adulte.

Remerciements

Je remercie les membres présents et passés de mon laboratoire pour leurs efforts pour mieux comprendre l'action de *FOXL2* et l'Université Paris Diderot-Paris 7, le Centre National de la Recherche Scientifique, la Ligue Nationale contre le Cancer, l'Institut Universitaire de France, l'Agence Nationale de la Recherche et la Fondation pour la Recherche Médicale (équipe labellisée, DEQ Z0150331757) pour leur soutien financier. Je remercie A. Chassot, S. Caburet, A.-L. Todeschini et M. El Zaiat pour leur lecture critique du texte.

RÉFÉRENCES

- [1] Lin Y-T, Capel B. Cell fate commitment during mammalian sex determination. *Curr Opin Genet Dev.* 2015;32:14-52.
- [2] Hughes IA. Disorders of sex development: a new definition and classification. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008;22:119-34.
- [3] Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, *et al.* A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 1990;346:240-4.
- [4] Salas-Cortés L, Jaubert F, Barbaux S, Nessmann C, Bono MR, Fellous M, *et al.* The human SRY protein is present in fetal and adult Sertoli cells and germ cells. *Int J Dev Biol.* 1999;43:135-40.

- [5] Barrionuevo F, Georg I, Scherthan H, Lécureuil C, Guillou F, Wegner M, et al. Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8. *Dev Biol.* 2009;327:301-12.
- [6] Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature.* 2008;453:930-4.
- [7] Hyon C, Chantot-Bastaraud S, Harbuz R, Bhourri R, Perrot N, Peycelon M, et al. Refining the regulatory region upstream of SOX9 associated with 46,XX testicular disorders of Sex Development (DSD). *Am J Med Genet A.* 2015;167A:1851-8.
- [8] Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier M-C, et al. Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol.* 2006;4:e187.
- [9] Moniot B, Declosmenil F, Barrionuevo F, Scherer G, Aritake K, Malki S, et al. The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development.* 2009;136:1813-21.
- [10] Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet.* 1999;87:349-53.
- [11] Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y, Agoulnik AI, Agoulnik IU, Harrison WR, et al. A transgenic insertion upstream of sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat Genet.* 2000;26:490-4.
- [12] Veitia RA, Nunes M, Quintana-Murci L, Rappaport R, Thibaud E, Jaubert F, et al. Swyer syndrome and 46,XY partial gonadal dysgenesis associated with 9p deletions in the absence of monosomy-9p syndrome. *Am J Hum Genet.* 1998;63:901-5.
- [13] Raymond CS, Parker ED, Kettlewell JR, Brown LG, Page DC, Kusz K, et al. A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum Mol Genet.* 1999;8:989-96.
- [14] Murphy MW, Lee JK, Rojo S, Gearhart MD, Kurahashi K, Banerjee S, et al. An ancient protein-DNA interaction underlying metazoan sex determination. *Nat Struct Mol Biol.* 2015; 22:442-51.
- [15] Garcia-Ortiz JE, Pelosi E, Omari S, Nedorezov T, Piao Y, Karmazin J, et al. Foxl2 functions in sex determination and histogenesis throughout mouse ovary development. *BMC Dev Biol.* 2009;9:36.
- [16] Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, et al. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell.* 2009;139:1130-42.
- [17] Auguste A, Chassot A-A, Grégoire EP, Renault L, Pannetier M, Treier M, et al. Loss of R-spondin1 and Foxl2 amplifies female-to-male sex reversal in XX mice. *Sex Dev.* 2011; 5:304-17.
- [18] Georges A, L'Hôte D, Todeschini AL, Auguste A, Legois B, Zider A, et al. The transcription factor FOXL2 mobilizes estrogen signaling to maintain the identity of ovarian granulosa cells. *eLife.* 2014;3.
- [19] Boulanger L, Pannetier M, Gall L, Allais-Bonnet A, Elzaïat M, Le Bourhis D, et al. FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat. *Curr Biol.* 2014;24:404-8.
- [20] Jameson SA, Lin Y-T, Capel B. Testis development requires the repression of Wnt4 by Fgf signaling. *Dev Biol.* 2012;370:24-32.
- [21] Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C, et al. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? *Biol Reprod.* 2014;90:85.
- [22] Pailhoux E, Vigier B, Chaffaux S, Serval N, Taourit S, Furet JP, et al. A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nat Genet.* 2001;29:453-8.

- [23] Zlotogora J, Sagi M, Cohen T. The blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome: delineation of two types. *Am J Hum Genet.* 1983;35:1020-7.
- [24] Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, et al. Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N Engl J Med.* 2014;370:94-9.
- [25] Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, et al. The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet.* 2001;27:159-66.
- [26] Moumné L, Dipietromaria A, Batista F, Kocer A, Fellous M, Pailhoux E, et al. Differential aggregation and functional impairment induced by polyalanine expansions in FOXL2, a transcription factor involved in cranio-facial and ovarian development. *Hum Mol Genet.* 2008;17:1010-9.
- [27] Laissue P, Lakhal B, Benayoun BA, Dipietromaria A, Braham R, Elghezal H, et al. Functional evidence implicating FOXL2 in non-syndromic premature ovarian failure and in the regulation of the transcription factor OSR2. *J Med Genet.* 2009;46:455-7.
- [28] Dipietromaria A, Benayoun BA, Todeschini A-L, Rivals I, Bazin C, Veitia RA. Towards a functional classification of pathogenic FOXL2 mutations using transactivation reporter systems. *Hum Mol Genet.* 2009;18:3324-33.
- [29] Todeschini A-L, Dipietromaria A, L'hôte D, Boucham FZ, Georges AB, Pandaranayaka PJE, 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.* 2011; 20:3376-85.
- [30] Benayoun BA, Batista F, Auer J, Dipietromaria A, L'Hôte D, De Baere E, 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; 18:632-44.
- [31] Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier A-C, et al. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development.* 2004;131:933-42.
- [32] Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, et al. Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet.* 2004;13:1171-81.
- [33] Elzaïat M, Jouneau L, Thépot D, Klopp C, Allais-Bonnet A, Cabau C, et al. High-throughput sequencing analyses of XX genital ridges lacking FOXL2 reveal DMRT1 up-regulation before SOX9 expression during the sex-reversal process in goats. *Biol Reprod.* 2014;91:153.
- [34] De Baere E, Lemercier B, Christin-Maitre S, Durval D, Messiaen L, Fellous M, et al. FOXL2 mutation screening in a large panel of POF patients and XX males. *J Med Genet* 2002;39:e43.
- [35] Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature.* 1999;397:405-9.
- [36] Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, et al. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet.* 2006; 38:1304-9.
- [37] Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Délot E, Chen XN, Dewing P, et al. Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet.* 2001; 68:1102-9.
- [38] Chassot A-A, Ranc F, Gregoire EP, Roepers-Gajadien HL, Taketo MM, Camerino G, et al. Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet.* 2008;17:1264-77.

- [39] Maatouk DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM, Capel B. Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet.* 2008; 17:2949-55.
- [40] Ottolenghi C, Omari S, Garcia-Ortiz JE, Uda M, Crisponi L, Forabosco A, et al. Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Hum Mol Genet.* 2005;14:2053-62.
- [41] Ottolenghi C, Pelosi E, Tran J, Colombino M, Douglass E, Nedorezov T, et al. Loss of Wnt4 and Foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum Mol Genet.* 2007 ; 16:2795-804.
- [42] Veitia RA. FOXL2 versus SOX9: a lifelong “ battle of the sexes ”. *BioEssays.* 2010;32:375-80.
- [43] Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, et al. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science.* 1999;286:2328-31.
- [44] Benayoun BA, Caburet S, Dipietromaria A, Bailly-Bechet M, Batista F, Fellous M, et al. The identification and characterization of a FOXL2 response element provides insights into the pathogenesis of mutant alleles. *Hum Mol Genet.* 2008;17:3118-27.
- [45] 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; 24:346-56.
- [46] Georges A, L'Hôte D, Todeschini AL, Auguste A, Legois B, Zider A, et al. The transcription factor FOXL2 mobilizes estrogen signaling to maintain the identity of ovarian granulosa cells. *eLife.* 2014;3.
- [47] McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:3368-72.

