L’implantation est caractérisée par les premiers contacts cellulaires permanents entre l’endomètre, tapissant l’utérus, et le conceptus (disque embryonnaire et tissus extra-embryonnaires). Cette étape se trouve être l’un des plus importants points de contrôle de la gestation nécessitant un dialogue finement régulé entre ces deux entités. Concernant les ruminants, un déclin de la fertilité a été observé notamment chez les vaches laitières hautes productrices. En effet, la moitié des gestations s’arrête pendant la période pré-implantatoire due à des mortalités embryonnaires précoces ainsi qu’à des défauts utérins. Il est apparu crucial d’affiner notre compréhension de la physiologie endométriale dans le but de mieux appréhender les mécanismes moléculaires liés à une implantation réussie ou défectueuse. Depuis 10 ans, des analyses exploratoires ont été mises en place dans le but d’étudier les profils d’expression de gènes endométriaux sous l’influence du cycle œstral, de la gestation précoce ou encore des stéroïdes ovariens comme la progestérone et les œstrogènes. En effet, l’association combinée de la progestérone et des œstrogènes fait partie intégrante du processus de réceptivité utérine au cours du cycle œstral et de la gestation précoce. Les œstrogènes induisent la prolifération des cellules endométriales à plus ou moins grande échelle selon l’espèce considérée, tandis que la progestérone entraine la différenciation des glandes endométriales ainsi que la sécrétion d’histotrophes nécessaire à l’élongation du conceptus (ions, nutriments, facteurs de croissances, hormones, etc …). Chez l’homme et la souris, la progestérone induit également le phénomène de décidualisation des cellules stromales en amont d’une implantation invasive de type hémochoriale. Cependant, nous nous sommes concentrés sur les espèces bovine et ovine dans lesquelles cette étape de décidualisation n’existe pas, car l’implantation est de type synépitheliochoriale, c'est-à-dire superficielle. Ces études à haut-débit sont

essentielles pour l'identification des gènes endométriaux clés pour la survie et la croissance du conceptus avant l'implantation. Notre laboratoire a réalisé une analyse transcriptomique à partir d'échantillons endométriaux collectés sur des vaches cycliques et gestantes au 20 ème jour post-oestrus correspondant respectivement à la phase folliculaire et au premier jour d'implantation. Plusieurs familles de facteurs de transcription apparaissent différentiellement exprimées dans cette étude, notamment *FOXL2*, un membre de la famille des Forkhead Box transcription factor considéré comme le gène clé de la différenciation ovarienne. En effet, *FOXL2* est connu pour être exprimé dans les cellules de la granulosa, de l'hypophyse antérieur ainsi que dans les paupières fœtales. Il a été démontré son rôle crucial dans la régulation des hormones gonadotropes ainsi que son rôle clé dans la différentiation et le maintien de la fonction ovarienne. Cette expression ectopique détectée dans l'endomètre bovin a été le point de départ de ce travail de thèse qui s'est intéressé à l'implication de *FOXL2* dans la physiologie endométriale.

Au travers de divers modèles physiologiques et expérimentaux bovins et ovins, *FOXL2* a été analysé au niveau transcriptionnel et protéique. Ainsi, il a été démontré que *FOXL2* est exprimé et régulé pendant le cycle œstral et la gestation précoce dans l'endomètre de ruminants. Plus spécifiquement, *FOXL2* apparait significativement plus exprimé en phase lutéale très précoce ainsi qu'en phase folliculaire, soit, en début et fin de cycle œstral, respectivement. Son expression au cours de la phase lutéale est significativement réduite. L'interféron-tau qui est le signal majeur de reconnaissance maternelle de la gestation chez les ruminants, n'a pas d'effet sur l'expression endométriale de *FOXL2*. Par la suite, la progestérone a été identifiée comme le régulateur majeur de l'expression endométriale de *FOXL2* chez la vache et la brebis alors que l'effet des estrogènes n'a pas été démontré. De

plus, la localisation cellulaire et sub-cellulaire de FOXL2 a été réalisée, démontrant ainsi que la localisation de la protéine était dépendante des niveaux de progestérone ainsi que de l'apposition du conceptus. L'action de la progestérone est médiée la plupart du temps par ses récepteurs nucléaires, PGR. Nos données suggèrent que l'action de la progestérone sur l'expression de FOXL2 pourrait être due à la fixation de ses récepteurs PGR sur le promoteur de FOXL2. En effet, un élément de réponse aux récepteurs progestérones a été identifié via une analyse *in silico* de la séquence promotrice bovine du gène *FOXL2*. Des études *in vitro* sont actuellement menées au laboratoire pour valider notre hypothèse de régulation directe de l'expression de *FOXL2* par la progestérone.

L'identification des fonctions biologiques de FOXL2 est associée à l'identification de ses gènes cibles dans l'endomètre. En comparant des analyses à haut-débit réalisées à partir de cellules KGN surexprimant *FOXL2* et à partir d'endomètre bovin au 20ème jour post-oestrus du cycle et de la gestation, 38 gènes apparaissent communs aux deux analyses, dont *FOXL2*. L'hypothèse est la suivante, les gènes cibles de FOXL2 identifiés dans l'ovaire se retrouvent exprimés dans l'endomètre bovin et seraient alors régulés également par FOXL2 dans ce tissu. Pour valider ou invalider cette hypothèse, 11 gènes putativement cibles ont été sélectionnés parmi les 37 sur la base de nos connaissances sur leur implication dans la physiologie endométriale. Suite à la surexpression de *FOXL2* dans des cellules endométriales bovines, l'analyse de leur transcrit sera réalisée. Ainsi des cultures primaires de cellules endométriales bovines ont été mises en place à partir d'utérus de trois vaches en pleine phase lutéale active, phase pendant laquelle *FOXL2* s'exprime peu. Les cultures ont été préparées de manière à différencier les cellules stromales des cellules épithéliales glandulaires. Après cinq jours de culture primaire, les deux types

cellulaires ont été transfectés transitoirement avec le plasmide d'expression contenant l'ADN complémentaire du gène caprin codant pour *FOXL2*. L'efficacité des transfections a été évaluée par immuno-détection de la protéine après transfection puis l'expression de 11 gènes candidats a été analysée. La surexpression de FOXL2 est associée à une localisation exclusivement nucléaire de la protéine validant la technique de transfection car un facteur de transcription n'est fonctionnel que dans le noyau des cellules. Concernant l'analyse des transcrits de gènes candidats, il est à noter qu'il existe une grande hétérogénéité entre les trois animaux sélectionnés se traduisant par une réponse différentielle pour chaque transcrit et chaque vache. Cependant, quelques gènes apparaissent fortement dérégulés par la surexpression de *FOXL2*. En particulier, *PTGS2* qui est un gène impliqué dans la réceptivité utérine apparait inhibé par FOXL2 alors que *SCARA5* et *RSAD2*, tout deux impliqués dans la réponse immunitaire sont stimulés. Enfin, *DLX5* apparait différentiellement régulé entre les cellules stromales et épithéliales glandulaires sous l'impact d'une surexpression de *FOXL2*. Cette régulation de gènes cibles est une étape préliminaire du processus d'identification des fonctions biologiques associées à FOXL2. Il serait intéressant d'utiliser une approche exploratoire pour déterminer l'ensemble des gènes cibles de FOXL2 dans ce tissu utilisant des techniques de RNA-sequencing. Cependant, une meilleure sélection des animaux serait à réaliser. Une synchronisation des animaux est à prévoir pour obtenir une meilleure homogénéité dans les résultats. Pour conclure, l'expression endométriale de *FOXL2* est fortement liée au processus de réceptivité utérine qui se déroule avant l'implantation et peut moduler l'expression de gènes endométriaux essentiels. Ainsi, l'inhibition de l'expression de FOXL2 au cours de la phase lutéale et de la gestation précoce serait un pré-requis indispensable au processus de réceptivité utérine ainsi qu'à

l’établissement de la gestation. Au travers de données issues d’analyses à haut-débit disponibles, il a été montré que FOXL2 apparait différentiellement détecté dans l’oviducte, la glande mammaire et le placenta, trois tissus appartenant aux organes de la reproduction femelles. L’évolution des espèces a permis l’acquisition de nouveaux organes et ainsi de nouvelles fonctions. De même, FOXL2 apparait conservé tout au long de l’évolution. De nouvelles analyses seront nécessaires pour déterminer si *FOXL2* est le gardien de la physiologie reproductive femelle.

Implantation is characterized by the first permanent cellular interactions between the endometrium, lining the uterus, and the conceptus (embryonic disk and extra-embryonic tissues) and appears to be one of the most important checkpoints of successful pregnancy. Regarding ruminant species, and more specifically dairy cows, half of pregnancies abort during the pre-implantation period due to early embryonic death and uterine defects. In the last decade, exploratory approaches have been developed to study endometrial genes expression under the influence of oestrous cycle, early pregnancy, and ovarian steroid hormones in order to identify systematically crucial endometrial genes for conceptus growth and survival leading to a successful implantation in ruminant specifically. A microarray analyse made at the laboratory based on endometrial samples collected from cyclic and pregnant cows at 20 days post-oestrous, corresponding respectively to the follicular phase and the implantation initiation. Several members of the transcription factor families appeared to be differentially expressed in this study including FOXL2, a member of the Forkhead box L sub-class originally considered as a key gene for ovarian differentiation. My PhD thesis focused on the implication of *FOXL2* gene in endometrial physiology. *FOXL2* gene had been demonstrated to be expressed and regulated during the oestrous cycle and early pregnancy in ruminant endometrium. Moreover, progesterone was identified as a master regulator of *FOXL2* endometrial expression in both cattle and sheep whereas estrogens have no impact. Based on candidate genes approach, over-expression of *FOXL2* gene induces a regulation of eleven putative FOXL2 target genes in primary endometrial stromal and glandular epithelial cells. In particular, *PTGS2* which is a positive regulator gene for uterine receptivity was shown to be inhibited whereas *SCARA5* and *RSAD2* expressions that were involved in immune response were shown to be stimulated as well as *DLX5*

expression was differentially regulated between stromal and glandular epithelial cells. Collectively, *FOXL2* endometrial expression is strongly linked to the uterine receptivity process prior to the implantation and modulates the expression of essential endometrial genes. Further investigations will be required to investigate whether *FOXL2* is the gatekeeper of female reproduction in the vertebrate species.