



HAL
open science

Rôles de FOXL2 dans la physiologie endométriale chez les bovins

Audrey Lesage

► **To cite this version:**

Audrey Lesage. Rôles de FOXL2 dans la physiologie endométriale chez les bovins. Biologie de la reproduction. Université Paris-Saclay, 2017. Français. NNT : 2017SACLS422 . tel-01865815v1

HAL Id: tel-01865815

<https://theses.hal.science/tel-01865815v1>

Submitted on 2 Sep 2018 (v1), last revised 3 Sep 2018 (v2)

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.

Rôles de *FOXL2* dans la physiologie endométriale chez les bovins

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay préparée à
l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)

École doctorale n°568 :
Signalisations et réseaux intégratifs en biologie (Biosigne)
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 6 décembre 2017, par

Audrey LESAGE-PADILLA

Composition du Jury :

Michael SCHUMACHER DR, Directeur de l'ED 568 Biosigne, INSERM (UMR 788, UFR de Médecine)	Président
Joëlle DUPONT DR, INRA (UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements)	Rapporteur
Philippe MONGET DR, INRA (UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements)	Rapporteur
Daniel VAIMAN DR, INSERM (Institut Cochin, Département Développement, Reproduction et cancer)	Examineur
Reiner VEITIA PU, Université Paris Diderot, CNRS (UMR Institut Jacques Monod)	Examineur
Marie-Noëlle DIEUDONNE PU, Université Versailles Saint Quentin (EA Gamète, Implantation, Gestation)	Examineur
Olivier SANDRA DR, INRA (UMR Biologie du développement et de la reproduction)	Directeur de thèse

*A mon grand-père parti trop tôt,
j'aurais aimé te rendre fier.*

« L'important dans la recherche, c'est l'imprévisible. »

François Gros et François Jacob

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier Dr. Joëlle Dupont et Dr. Philippe Monget d'avoir accepté d'évaluer la qualité de ce manuscrit. Merci au Dr. Michaël Schumacher et au Dr. Reiner Veitia pour votre participation au jury. Je voulais également remercier le Dr. Daniel Vaiman de me suivre depuis toutes ces années. Vous m'avez donnée ma chance en Master 1 puis supportée quelques temps au début de ma thèse et malgré tout vous êtes encore là. Merci au Dr Marie-Noëlle Dieudonné pour votre participation à mon comité de thèse, pour votre gentillesse, votre bienveillance et votre présence dans mon jury.

Je remercie le Dr. Gabriel Livera et le Dr. Maëlle Pannetier pour leur participation à mon comité de thèse. Merci Maëlle de m'avoir accueillie et accompagnée lors de mes premiers pas dans l'univers merveilleux de *FOX2*.

Un énorme merci à Olivier Sandra, de m'avoir accueillie et soutenue depuis maintenant 5 ans. Tu m'as fait confiance pour ce projet qui nous a donné quelques sueurs froides. Merci pour ton encadrement et la générosité dont tu as fait preuve à chaque fois que j'en ai eu besoin. Tu as su être là dans les bons comme dans les mauvais moments. Tu as beau dire que tu n'as pas le temps tu as toujours été présent et encore une fois je t'en remercie. Tu m'as fait découvrir ta vision de la science et de la recherche, pas toujours facile à suivre mais je me suis accrochée ! Cette thèse a été une aventure exceptionnelle et je suis fière de l'avoir faite à tes côtés (et d'y avoir survécu).

Aaaaaah ma petite Pierrette (Reinaud) ! Un merci n'est pas suffisant pour exprimer ma reconnaissance. Comme j'aime le dire tu es ma mamie de labo ! Tu m'as fait partager ton immense savoir sur les joies de la culture cellulaire. Bien plus qu'une collègue tu as été là pour me remotiver quand j'en avais besoin. Sans toi je ne serais probablement pas allée jusqu'au bout de ce projet. Nous avons passé tellement de temps ensemble en pièce de culture que nous sommes capables d'anticiper les gestes de l'autre... on forme une sacrée équipe d'une efficacité redoutable ! Tu es passionnée dans tout ce que tu fais et tu sais nous le faire partager. Culture cellulaire, immuno, western, couture, ... je ressors de ces années auprès de toi avec de solides bagages pour mon avenir alors merci !

Un grand merci à Corinne (Giraud-Delville) pour toutes ces heures à faire des qPCR et/ou papoter. Tu as été d'un soutien technique précieux, toujours à l'écoute et prête à m'aider à boucler les projets. Certains jours on discutait plus qu'on ne travaillait mais ça faisait du bien ! Dans le genre pipette, merci à Olivier (Dubois) pour ton aide quasi quotidienne et surtout les discussions à n'en plus finir sur les manipes, les plantes... ou n'importe quel sujet d'ailleurs. Un

immense merci à Philippe (Bolifraud) pour cette super coloc' dans ton bureau et surtout pour la bienveillance dont tu as fait preuve à mon égard pendant tout ce temps.

Je tenais à remercier Jean-François Oudin pour les nombreuses amplifications de plasmides que tu as dû faire pour les mises au point de protocoles. Tu as géré ça d'une main de maître. Un grand merci à l'ensemble de l'équipe EMDI pour l'accueil qui m'a été fait et tout particulièrement à Laurent Galio jamais à court de conseils ou de jeux de mots pourris. Merci à Isabelle Hue qui a su être présente pour moi à la fin de mon master 2 alors que j'étais prête à tout laisser tomber.

Merci à Gilles Charpigny pour son soutien et sa contribution aux divers protocoles de biopsies utérines. Je remercie également à Christophe Richard pour la réalisation des biopsies et la pédagogie dont il a su faire preuve lors des prélèvements. Merci à l'ensemble du personnel de l'UCEA qui a géré les protocoles des synchronisations et qui a toujours été très accueillant.

Merci aux membres de l'équipe 1 notamment le Dr. Véronique Duranthon et Catherine Archilla pour leur accueil le temps des analyses transcriptomiques. Vous avez été d'une grande patience lors de mon initiation aux joies du microarray. Merci à Marco Moroldo et Jérôme Lecardonnel pour leur accompagnement dans la réalisation et l'analyse des puces au sein de leur plateforme. Un grand merci à Luc Jouneau pour sa patience et son aide précieuse pour l'analyse bioinformatique des données ChiP-seq et microarray. Je t'en ai donné du fil à retordre mais tu as toujours été présent pour répondre à mes nombreuses questions.

Je tenais à remercier Corinne Cotinot de m'avoir accueillie au sein de l'unité Biologie du Développement et de la Reproduction de l'INRA de Jouy-en-Josas. Merci à Khaïs Algubory pour nos longues discussions sur le stress oxydatif. Un immense merci à Michèle Dahirel pour ton soutien et le temps que tu m'as accordé quand le moral n'était pas là. Plus globalement merci à l'ensemble de l'unité pour ces supers moments passés avec vous.

Merci à Caroline et Anaïs qui m'ont pris sous leur aile quand je suis arrivée au laboratoire. Après leur soutenance elles m'ont transmis le relais et confié leur « bébé ». Avec votre bonne humeur légendaire, vous m'avez donné l'envie de poursuivre vos travaux et de faire cette thèse. Je tenais également à remercier les stagiaires Mélanie Poirée et Marion Delessard qui ont contribué à ce projet. Merci aussi à Sandra Lignier, Rita Gouesse et ma petite Maud Pez pour leur bonne humeur communicative. Ne changez rien les filles !

Merci à la « dream team des morulas » ! Merci Sarah et Morgane pour ces soirées sushis, pour les longues discussions (plus ou moins cohérentes) à se plaindre de nos thèses alors que finalement on les aime (presque) nos thèses ! Bon sinon on s'organise comment pour l'élevage

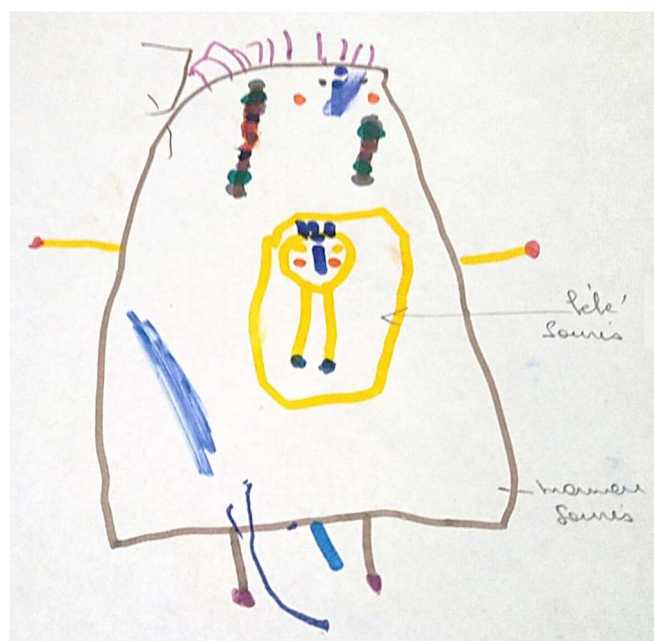
de licornes ?! Merci à Doc'J et l'ensemble des personnes de l'association qui m'ont permis de m'évader un peu de temps en temps et de me rendre compte que je n'étais pas seule dans mes galères. Merci à Pascal, Pauline, Tatiana, JP, Maxime, Audrey, Clara et tant d'autres !

Merci à mes amis qui ont été d'un soutien sans faille et qui ont été patients avec moi pendant ses années. Je sais que je n'ai pas toujours été très disponible et que vous ne m'en voulez pas. Merci de votre compréhension, je vous adore !

Enfin je voulais remercier ma famille de m'avoir supporté toutes ces années. Merci à mes parents d'avoir cru en moi et de m'avoir permis d'aller au bout de mes rêves. Si aujourd'hui j'en suis là c'est évidemment grâce à vous et quelque part cette thèse c'est un peu votre bébé aussi ! Je vous aime et j'espère vous rendre fiers. Merci à mon frère de m'avoir demandé presque tous les jours si ma thèse avançait. J'ai eu envie de t'étriper plus d'une fois mais c'était purement par amour bien sûr. Maintenant que j'en vois le bout il va falloir que tu trouves autre chose pour m'embêter mais je te fais confiance pour ça !

Mille mercis à mon mari qui est probablement celui qui a le plus souffert de cette thèse ! Merci d'avoir été aussi compréhensif et patient, je sais que ça n'a pas été facile tous les jours mais bon je t'avais prévenu ! Tout simplement merci d'être là. Je t'aime plus que tout.

Pour finir, la thèse est une expérience intense, longue, faite de moments de doute et de petits bonheurs. La biologie de la reproduction est un thème qui me passionne depuis longtemps... très longtemps. Merci à tous ceux qui m'ont permis d'en arriver là !



Audrey Lesage-Padilla (3ans, 10 mois et 24 jours) ; le 27 avril 1993

Table des matières

Table des figures.....	- 3 -
Liste des abréviations	- 6 -
INTRODUCTION	- 9 -
1. La fertilité chez la vache laitière haute productrice.....	- 10 -
a. Les problématiques d'élevage laitier	- 11 -
b. L'évolution de la fertilité	- 14 -
2. Le cycle sexuel chez les bovins	- 18 -
a. Le cycle œstral.....	- 18 -
b. Le cycle ovarien et son contrôle hormonal	- 19 -
3. La physiologie endométriale bovine	- 22 -
a. La structure de l'endomètre bovin.....	- 22 -
b. Le transport des spermatozoïdes	- 25 -
c. Le rôle des sécrétions utérines lors de la gestation précoce	- 25 -
d. L'implantation embryonnaire.....	- 28 -
4. La communication endomètre-conceptus au cours de la gestation précoce	- 31 -
a. La reconnaissance maternelle de la gestation : rôle de l'interféron Tau.....	- 31 -
b. L'inflammation lors de la mise en place de la gestation	- 32 -
c. Le contrôle hormonal de la gestation précoce.....	- 33 -
d. Le stress oxydatif au cours de la gestation précoce.....	- 34 -
5. Le gène <i>FOXL2</i> et son rôle dans la physiologie de la reproduction.....	- 36 -
a. Le rôle des facteurs FOX dans la reproduction	- 36 -
b. La découverte du gène <i>FOXL2</i>	- 38 -
c. Le rôle de <i>FOXL2</i> dans la physiologie de la reproduction	- 39 -
d. Les mutations de <i>FOXL2</i> chez l'Homme	- 43 -
e. Les mutations de <i>FOXL2</i> chez les animaux modèles	- 44 -
f. Les gènes cibles de <i>FOXL2</i>	- 46 -
6. <i>Les objectifs de la thèse</i>	- 49 -
PARTIE 1 : Développement d'un modèle <i>in vitro</i> de cultures primaires de cellules endométriales bovines	- 51 -
1. Introduction.....	- 52 -
2. Mise en place des cultures primaires de cellules endométriales bovines à partir de biopsies ...	- 57 -
a. Le prélèvement de l'endomètre.....	- 57 -

b.	Le protocole de mise en culture des cellules endométriales issus de biopsies	- 61 -
c.	L'évolution des cultures primaires de cellules endométriales bovines	- 62 -
d.	Comparaison des cultures primaires de cellules endométriales bovines en fonction du jour de prélèvement du tissu.....	- 65 -
3.	Optimisation des conditions de transfection transitoire dans les cultures primaires d'endomètre bovin.....	- 68 -
a.	Optimisation du protocole de transfection transitoire par lipofection	- 69 -
b.	Transfection transitoire des cellules endométriales bovines par magnétofection.....	- 70 -
c.	Validation de la surexpression de <i>FOXL2</i> dans les cultures primaires de cellules endométriales bovines	- 72 -
4.	Discussion	- 76 -
PARTIE 2 : Effet du métabolisme maternel sur l'expression des gènes endométriaux		- 78 -
1.	Introduction.....	- 79 -
2.	Modèle expérimental	- 82 -
3.	Article 1	- 84 -
4.	Conclusions de l'article 1.....	- 119 -
PARTIE 3 : Identification des gènes cibles de <i>FOXL2</i> dans les cellules endométriales bovines		- 120 -
1.	Introduction.....	- 121 -
2.	Modèle expérimental	- 123 -
3.	Article 2	- 125 -
4.	Expression des gènes cibles de <i>FOXL2</i> dans l'endomètre	- 161 -
5.	Conclusions de l'article 2.....	- 165 -
DISCUSSION GENERALE		- 167 -
REFERENCES		- 176 -
ANNEXES.....		- 188 -
1.	<i>Annexes</i>	- 189 -
2.	<i>Communications orales</i>	- 195 -
3.	<i>Posters</i>	- 197 -
4.	<i>Publications supplémentaires</i>	- 201 -
5.	<i>Collaborations</i>	- 246 -

Table des figures

Introduction		
Fig 1	Croissance théorique des génisses laitières et les différentes phases clés.	10
Fig 2	Relation entre gain moyen quotidien entre la naissance et la puberté (GMQ) et l'apparition de la puberté.	11
Fig 3	Corrélation inverse entre de taux de conception (CR%) et la production annuelle de lait (kg/yr) chez la vache de race Holstein aux Etats-Unis.	12
Fig 4	Impact du délai d'obtention d'une gestation sur les performances reproductives.	13
Fig 5	Evolution des taux de réussite des inséminations artificielles chez les génisses et vaches de race Prim'Holstein entre 1999 et 2012.	15
Fig 6	Evolution des performances reproductives chez principales races laitières françaises entre 1999 et 2012.	15
Fig 7	Evolution de l'utilisation des semences sexées en fonction de la race et du statut de la femelle.	16
Fig 8	Index global pour la sélection génétique – exemple de la race Prim'Hosltein.	17
Fig 9	L'œstrus chez les bovins – Comportement de l'animal et fenêtre d'insémination.	18
Fig 10	Le cycle œstral chez l'espèce bovine.	20
Fig 11	Structure morphologique de l'utérus bovin.	22
Fig 12	Coupe transversale de corne utérine bovine.	23
Fig 13	Structure des placentomes bovins.	24
Fig 14	Transport du conceptus au cours de la gestation précoce.	25
Fig 15	Développement pré implantatoire du conceptus bovin.	26
Fig 16	Les grandes étapes de l'implantation chez les ruminants.	29
Fig 17	Mécanisme d'action de l'interféron Tau au cours du cycle ou de la gestation précoce.	31

Fig 18	Alignement de la séquence protéique de FOXL2 chez les vertébrés.	38
Fig 19	Schéma de la structure du gène FOXL2 bovin.	39
Fig 20	Evolution de l'expression de Foxl2 dans l'ovaire de souris.	40
Fig 21	Expression de FOXL2 au cours du cycle et de la gestation dans l'endomètre bovin.	41
Fig 22	Localisation de FOXL2 au cours du cycle œstral et à l'implantation dans l'endomètre bovin.	42
Fig 23	Atteintes physiques des patients atteints de BPES.	43
Fig 24	Liste non exhaustive de cibles transcriptionnelles de FOXL2 dans l'hypophyse et les ovaires.	48

Partie 1

Fig 25	Liste non exhaustive des analyses transcriptomiques de l'endomètre bovins.	52
Fig 26	Comparaison in silico des gènes orthologues entre l'endomètre bovin et les cellules KGN surexprimant FOXL2.	56
Fig 27	Expression des gènes cibles putatifs de FOXL2 dans les fibroblastes et les cellules épithéliales glandulaires.	55
Fig 28	Les principales étapes du prélèvement de l'endomètre à partir d'utérus entier.	57
Fig 29	Dissection de l'utérus pour la culture primaire de cellules endométriales.	58
Fig 30	Les principales étapes du prélèvement de l'endomètre par biopsie.	59
Fig 31	Rendement d'isolement des cellules endométriale en fonction du mode de prélèvement.	60
Fig 32	Evolution schématique de cellules animales en culture.	63
Fig 33	Suivi des cultures primaires de cellules endométriales bovines – fibroblastes et épithéliales glandulaires.	64
Fig 34	Caractérisation des cellules utérines bovines.	64
Fig 35	Prélèvements des tissus endométriaux bovins au cours du cycle œstral.	65
Fig 36	Variations de FOXL2 dans les cellules endométriales bovines en fonction du jour de prélèvement de l'endomètre.	67

Fig 37	Protocoles de transfection transitoire des cellules endométriales bovines.	68
Fig 38	Observation au microscope inversé à fluorescence des fibroblastes endométriaux bovins transfectés transitoirement par lipofection par un plasmide GFP.	69
Fig39	Observation au microscope inversé à fluorescence des cellules épithéliales glandulaires endométriales bovines transfectés transitoirement par lipofection.	70
Fig 40	Observation au microscope inversé à fluorescence des cellules endométriales bovines transfectées transitoirement.	71
Fig 41	Surexpression de FOXL2 dans les cultures primaires de cellules endométriales bovines.	73
Fig 42	Effet de la transfection transitoire sur l'expression d'ATF3 et de TNFAIP3, des gènes cibles putatifs de FOXL2.	74
Fig 43	Expression des gènes cibles putatifs de FOXL2 dans les fibroblastes et les cellules épithéliales glandulaires.	75

Partie 2

Fig 44	Suivi hebdomadaire des vaches en lactation (triangle), des vaches tarées (carré) et des génisses (losange).	80
Fig 45	Design expérimental du modèle métabolique.	83

Partie 3

Fig 46	Gènes cibles de FOXL2 dans l'axe hypothalo-hypophysaire-gonade.	122
Fig 47	Protocole expérimental du modèle <i>in vitro</i> de surexpression de FOXL2 dans les cultures primaires de cellules endométriales bovines par transfection transitoire.	123
Fig 48	Expression de gènes cibles de FOXL2 dans l'endomètre bovin au cours du cycle œstral et de la gestation précoce.	161
Fig 49	Localisation cellulaire des protéines FOXL2 et DLX5 dans l'endomètre bovin.	163

Discussion générale

Fig 50	Mise à jour des gènes cibles de FOXL2 dans l'axe reproducteur chez la femelle.	175
--------	--	-----

Liste des abréviations

AA	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMH	Hormone anti müllerienne
AP1	Activator Protein 1
AR	Récepteur aux androgènes
ARN(m)	Acide ribonucléique (messenger)
ATF3	Activating transcription factor 3
ATP	Adénosine triphosphate
BAX	BCL2 associated X
BCL2	BCL2 apoptosis regulator
BCL2A1	B cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1
BHB	β hydroxybutyrate
BPES	Blepharophimosis Ptosis Epicanthus Inversus Syndrome
C2ORF29	CNOT11 ; CCR4-NOT transcription complex subunit 11
CAR	Caroncule
CAT	Catalase
CCL	C-C motif chemokine ligand
Cga	Glycoprotein hormones, alpha polypeptide
CJ	Corps jaune
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CSF2	Colony stimulating factor 2
CXCL	Chemokine C-X-C motif ligand
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DLX5	Distal-less homeobox member 5
DMRT1	Doublesex and Mab-3 related transcription factor 1
DO	Densité optique
DRY	Vache tarie
E2	Œstrogènes
EG	Cellules épithéliales glandulaires
EL	Cellules épithéliales luminales
ESR	Récepteurs aux oestrogènes
FOS	Fos proto-oncogene
FOX	Forkhead box protein
FOXL2	Forkhead box protein subfamily L member 2
FSH	Hormone folliculo-stimulante
FST	Follistatin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
IFI44	Interferon induced protein 44
GFP	Green fluorescent protein

GMQ	Gain moyen quotidien
GnRH	Gonadotrophine releasing hormone
GnRHR	Gonadotrophine releasing hormone receptor
GP	Glande profonde
GPx	Glutation peroxidase
GRAS	GnRH receptor activating sequence
GS	Glande superficielle
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
HEIF	Génisse
IA	Insémination artificielle
IA1	Première insémination artificielle
IAF	Insémination artificielle fécondante
ICAR	Zone Intercaronculaire
IFN	Interferon
IFNAR	Récepteur à l'interféron alpha
IFNT	Interféron Tau
IGF1	Insulin growth factor-1
ISG	Interferon stimulated genes
ITS	Insuline-Transférine-Sélénium
IVIA1	Intervalle vêlage-1ère insémination artificielle
IVV	Intervalle vêlage-vêlage
jpo	Jours post œstrus
LACT	Vache en lactation
LH	Hormone lutéinisante
MEC	Matrice Extra Cellulaire
MMP	Metalloprotease
MUC1	Mucin 1
MX 1/2	MX dynamin like GTPase 1 or 2
NEB	Bilan énergétique négatif
NEFA	Acide gras non estérifié
NK	Cellules Natural Killer
NLS	Séquence de localisation nucléaire
NOBOX	Oogenesis homeobox
O2	Oxygène
OXT	Ocytocine
OXTR	Récepteur à l'ocytocine
P4	Progestérone
PAF	Paraformaldéhyde
PBS	Phosphate buffered saline
PGF2 α	Prostaglandine F2 α
PGR	Récepteur à la progestérone nucléaire

PGRCM	Récepteur à la progestérone membranaire
PIS	Polled intersex syndrome
PLET1	Placenta expressed transcript 1 - C11ORF34
POS	Polykystic ovary syndrom
PPARG	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
RGS2	Regulator of G-protein signaling 2
ROS	Reactive oxygen species
RPL19	Ribosomal protein L19
RSAD2	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2
RT-qPCR	Real time - quantitative polymerase chain reaction
SCARA5	Scavenger receptor class A member 5
SF1	Splicing factor 1
SLC30A6	Solute carrier family 30 member 6
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SOD	Superoxide dismutase
SOX9	SRY-box9
SPP1	Secreted phosphoprotein 1
SSP1	Sécrétion de l'ostéopontine
STAR	Steroidogenic Acute Regulatory protein
TXNIP	Thioredoxin interacting protein
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
Str	Stroma
SUZ12	Polycomb repressive complex 2 subunit
SVF	Sérum de veau foetal
TAP	Peptide transporter
TESCO	Sox9 testis enhancer TES
TGF β	Transforming growth factor
TNFAIP3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Wnt	Wingless
α GSU	Sous-unité commune des hormones hypophysaires

INTRODUCTION

1. La fertilité chez la vache laitière haute productrice

Chez les bovins, les performances de reproduction sont évaluées par deux critères : la fertilité et la fécondité. La *fertilité* se définit comme la capacité de la femelle à être fécondée et à mener la gestation à terme. La *fécondité* quant à elle est l'aptitude de la femelle à mener la gestation à terme dans les délais requis, elle englobe donc la fertilité.

La croissance de la *génisse*¹ est classiquement découpée de quatre phases distinctes : (I) la phase lactée de la naissance jusqu'au sevrage, (II) la phase pré pubère du sevrage jusqu'à l'apparition de la puberté, (III) la phase post pubère jusqu'à la mise à la reproduction et enfin (IV) la gestation (Fig 1, Le Cozler, 2013).

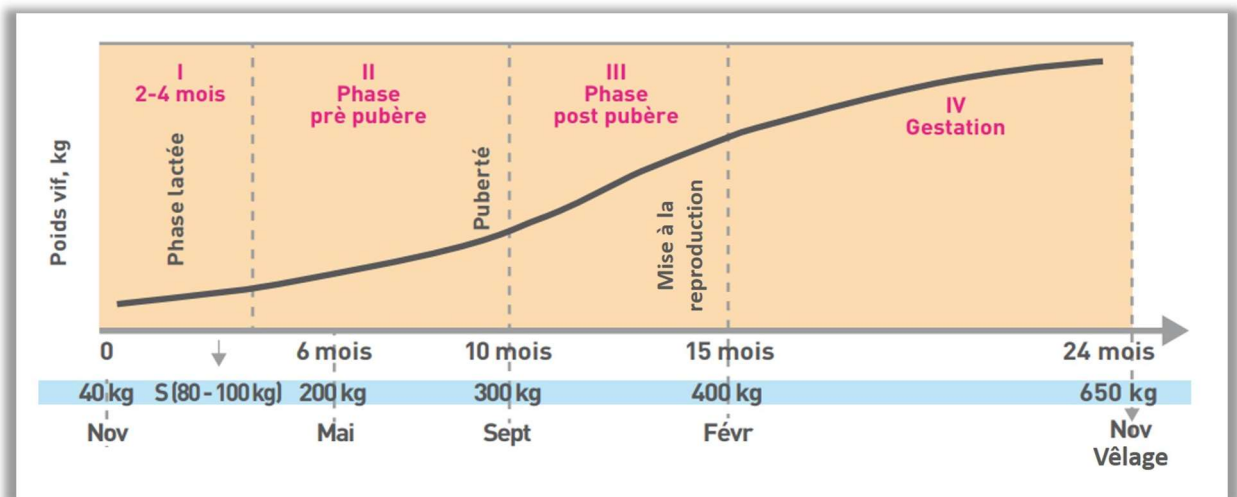


Figure 1 : Croissance théorique des génisses laitières et les différentes phases clés.

Exemple d'un vêlage à l'automne à 24 mois. La courbe représente l'évolution du poids vif de l'animal en kg de sa naissance jusqu'à son premier vêlage. La femelle est sevrée (S) lorsqu'elle atteint 80 à 100kg.

La première gestation débute en moyenne au 15^{ème} mois (adapté de Le Clozler, 2013).

L'âge de la puberté dépend du développement de l'animal et donc de son gain moyen quotidien (GMQ) depuis sa naissance. Plus la croissance est élevée et plus la puberté est précoce (Fig 2, Troccon and Petit, 1989). Les estimations de l'héritabilité² de la puberté sont très variables en fonction de la race, de très faible à élevée, avec des valeurs de h^2 allant de 0,1 à 0,6 (Le Cozler, 2013). Les pratiques d'élevage et plus particulièrement l'alimentation ont un impact sur la croissance de l'animal et ses performances

¹ Femelle n'ayant jamais vêlé.

² L'héritabilité (h^2) est indiquée comme valeur entre 0 et 1. Un h^2 inférieur à 0,2 est considéré comme faible, entre 0,2 et 0,4 comme moyen et supérieur à 0,4 comme élevé. Plus l'héritabilité d'un caractère est élevée, plus le succès zootechnique attendu est grand.

reproductives. Cependant il n'existe pas de consensus sur les effets à court et long terme d'une alimentation riche sur le développement mammaire et la production laitière (Cozler *et al.*, 2008).

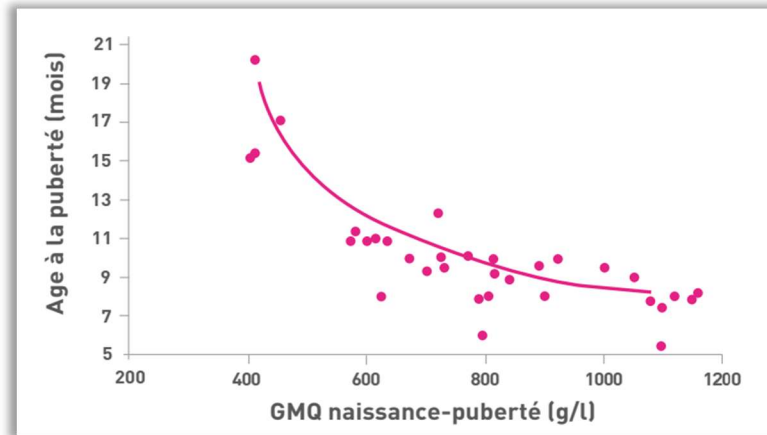


Figure 2 : Relation entre gain moyen quotidien entre la naissance et la puberté (GMQ) et l'apparition de la puberté. (Le Cozler, 2013).

Chez la génisse laitière, le premier vêlage et donc la première lactation débutent bien souvent avant la fin de sa croissance, soit lorsque l'animal a atteint 85 à 90% de son poids adulte. Les fonctions de reproduction et de croissance sont alors en compétition. La reprise d'activité sexuelle post partum, l'apparition du comportement d'*œstrus* et la réussite de l'insémination artificielle (IA) chez la vache sont les principaux facteurs limitants de la fertilité. Dans ce chapitre nous traiterons dans un premier temps de l'impact des troubles de la fertilité au sein des élevages, puis nous ferons un état des lieux de l'évolution de la fertilité dans le cheptel français.

a. Les problématiques d'élevage laitier

Depuis près de 50 ans nous observons un *déclin des performances reproductives* au sein des élevages bovins, tout particulièrement chez les vaches laitières hautes productrices (Norman *et al.*, 2009 ; Le Mezec, 2014). Le marché économique agricole est confronté à la mondialisation et récemment à une crise du prix du lait. C'est dans ce contexte économique difficile que les éleveurs doivent rentabiliser au mieux leur outil de production afin d'assurer la viabilité de leur exploitation.

La demande sans cesse croissante de lait a conduit à une sélection *génétique intensive* des bovins laitiers afin d'augmenter la production par animal. En 2014, une vache laitière haute productrice de race Holstein produisait en moyenne 9 329 kg de lait par an (Institut d'élevage). Les progrès génétiques et les changements de conduite d'élevage de ces 30 dernières années ont permis d'augmenter la production de lait de 2 400 kg par animal par an et de rallonger la période de lactation de 2 mois en l'espace de 20 ans. Jusqu'au début des années 2000, la sélection des animaux permettait d'obtenir chaque année une augmentation de la production laitière d'environ 100 kg par animal. Cette dynamique est désormais ralentie et l'Institut d'élevage prévoit une stabilisation de la production dans les années à venir (Le Mezec, 2014). La lactation dure aujourd'hui environ un an. La gestation suivante se met donc en place au cours de cette période de production intensive de lait et cela impacte fortement les performances reproductives (Wathes *et al.*, 2007 ; Fig 3).

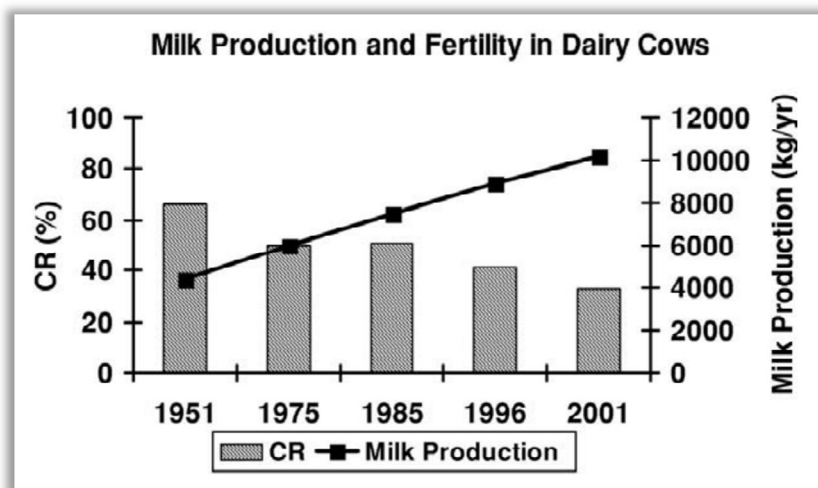


Figure 3 : Corrélation inverse entre de taux de conception (CR%) et la production annuelle de lait (kg/yr) chez la vache de race Holstein aux Etats-Unis. (Butler *et al.*, 2003).

La production de lait ne pouvant avoir lieu qu'après la naissance d'un veau, la dégradation des performances reproductives entraîne des pertes économiques non négligeables pour l'éleveur. Les troubles de la reproduction représentent environ 9% des dépenses de santé dans les élevages (Jegou *et al.*, 2006). Il y a d'un côté une augmentation des coûts directs tels que les frais vétérinaires et les frais d'inséminations, et d'un autre une augmentation des coûts indirects due à la diminution du nombre de veaux produits et de la longévité des animaux. En effet, on estime que l'infertilité est à l'origine d'environ 20% des réformes prématurées (Boichard, 1988). L'objectif agronomique usuel d'un

élevage standard est de produire un veau par vache et par an. En cas de perturbation de la fertilité ou de la fécondité, on observe un allongement de l'intervalle entre deux vêlages associé à des pertes économiques pour l'éleveur pouvant atteindre 50€ par vache et par cycle perdu (Seegers *et al.*, 1999; Hobé *et al.*, 2008).

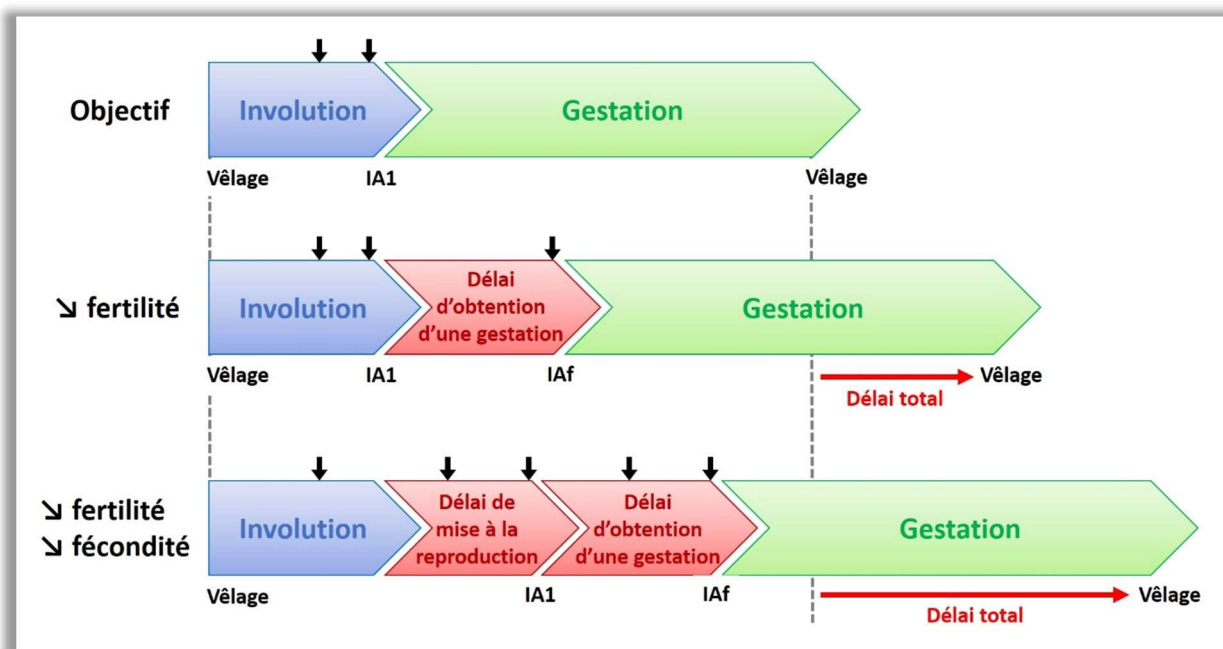


Figure 4 : Impact du délai d'obtention d'une gestation sur les performances reproductives.

Flèches noires verticales = Chaleurs soit début d'un nouveau cycle ;

IA1 = première insémination artificielle ; IAf = insémination artificielle fécondante.

(d'après V. Mauffré, thèse ; Hobé *et al.*, 2008).

Après le vêlage il existe un délai de 45 jours minimum nécessaire à l'*involution* de l'utérus avant la reprise de la cyclicité (Hobé *et al.*, 2008). Pour garder l'objectif d'un veau par an par vache, la fécondation devrait idéalement avoir lieu entre le 45^{ème} et le 88^{ème} jour post partum. Afin de maîtriser la reproduction de leur cheptel, 90% des éleveurs ont recours à l'IA (sondage <http://agreste.agriculture.gouv.fr>). Associée à la synchronisation des chaleurs³, cette technique leur permet de regrouper les fécondations et les vêlages afin de mieux organiser leur temps de travail et diminuer les coûts de main d'œuvre en limitant les périodes d'interventions sur les animaux.

³ A l'aide d'un implant vaginal (ex. CIDR) ou sous-cutané (ex. CRESTAR) diffusant de la progestérone ou un analogue. Ces dispositifs sont couplés à des injections de prostaglandines (pour induire la régression du corps jaune) puis d'un analogue de la FSH (pour déclencher l'ovulation).

La maîtrise de la reproduction a donc un intérêt économique non négligeable chez les animaux de rente tels que les bovins. Cependant améliorer les performances reproductives suppose d'en connaître les facteurs de risque, leurs mécanismes d'action et de mettre en place une stratégie d'intervention.

b. L'évolution de la fertilité

En 2014, le cheptel bovin laitier français comprenait 7 millions de vaches laitières et 67% de ces femelles étaient des laitières hautes productrices de race Prim'Holstein⁴ (<http://agreste.agriculture.gouv.fr/>). La sélection des animaux vise à augmenter la productivité et obtenir des animaux avec une mamelle conforme afin de produire un lait de qualité en grande quantité et dans de bonnes conditions (pour l'animal et pour l'éleveur). Depuis 2001, les professionnels accordent de plus en plus d'importance à la capacité de reproduction de l'animal lors de la sélection génétique (Le-Mezec, 2014). Pour répondre aux préoccupations de l'éleveur il est nécessaire que la femelle ait une bonne longévité, et donc qu'elle soit capable de supporter plusieurs gestations, qu'elle soit résistante aux infections, et notamment aux mammites⁵, et qu'elle soit fertile.

Le statut physiologique de l'animal impacte fortement ses performances reproductives. Les génisses présentent des taux de réussite à la *1^{ère} Insémination Artificielle (ou IA1)* supérieurs à ceux des vaches de la même race (exemple ici de la race Prim'Holstein, Fig 5A). Entre 1999 et 2004 le taux de réussite de l'IA1 était en nette diminution chez les vaches mais pas chez les génisses. Depuis 2008, le taux de réussite de l'IA1 reste relativement stable chez les génisses comme chez les vaches. Le taux de réussite des IA totales en 2012 était de 55% chez les génisses contre 33 à 38 % seulement chez les vaches de race Prim'Holstein (Fig 5B). Nous observons également une diminution de ce taux en fonction du nombre de vêlages de la femelle.

⁴ La race Prim'Holstein est une race française de bovins laitiers. Au Canada, on retrouve la race Holstein Friesian et aux Etats-Unis la race Holstein. Les éleveurs de chaque pays ont effectué des croisements pour créer de nouvelles races dérivées de la Holstein néerlandaise. Les Holsteins représentent aujourd'hui la première race laitière au monde.

⁵ Infection de la mamelle pouvant apparaître au cours de la traite.

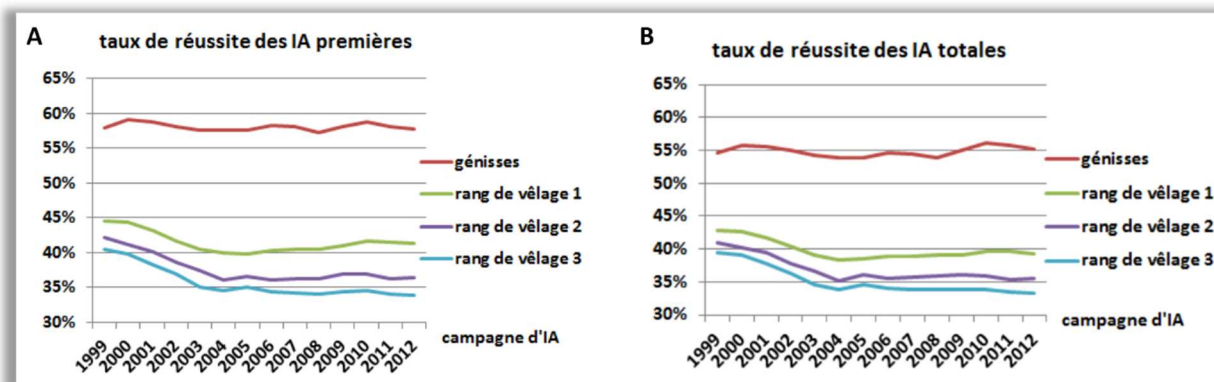


Figure 5 : Evolution des taux de réussite des inséminations artificielles chez les génisses et vaches de race Prim'Holstein entre 1999 et 2012. A- Taux de réussite de la 1^{ère} IA. B- Taux de réussite des IA totales (Idele, Fertilité des principales races laitières, 2015).

Après vêlage et au cours de la lactation, le retour à la reproduction de l'animal est une étape déterminante. Le taux de non-retour en cycle entre le 18^{ème} et le 90^{ème} jour post partum est un prédicteur du taux de réussite des IA. Entre 1999 et 2012, l'intervalle vêlage-IA1 moyen (IVIA1) s'est allongé chez les trois principales races laitières françaises (Montbéliardes : 82 jours ; Normande : 85 jours et Prim'Holstein : 101 jours ; Fig 6A). L'intervalle entre la 1^{ère} IA et l'IA fécondante quant à lui est stable (Montbéliardes : 27 jours ; Normande : 30 jours et Prim'Holstein : 39 jours). Il faut donc en moyenne deux inséminations pour obtenir une fécondation. Enfin nous avons vu que pour une rentabilité optimale des exploitations, l'éleveur devait produire un veau par vache et par an. L'intervalle vêlage-vêlage (IVV) optimal devrait donc être d'environ 365 jours. Cependant l'IVV est de 395 jours chez les Montbéliardes, 399 jours chez les Normandes et 422 jours chez les Prim'Holstein (Fig 6B). La race Prim'Holstein est la race laitière française qui produit le plus de lait et dont les performances reproductives sont les plus altérées.

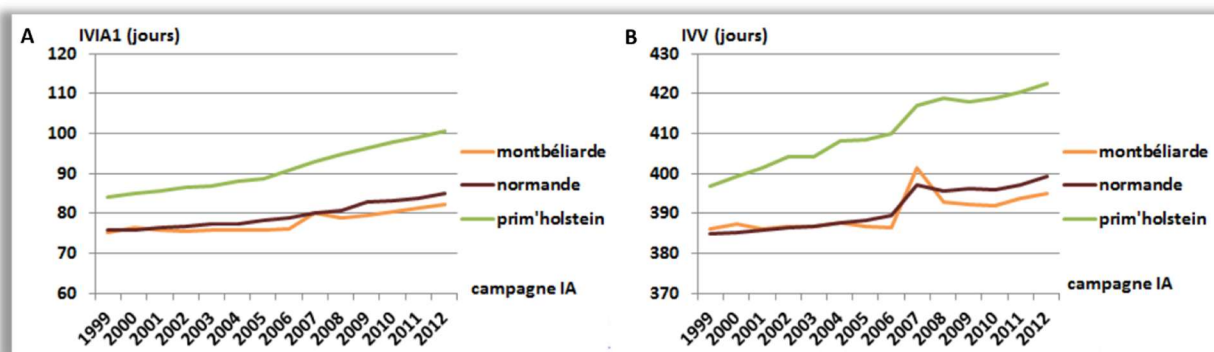


Figure 6 : Evolution des performances reproductives chez principales races laitières françaises entre 1999 et 2012. A- Intervalle entre le vêlage et la 1^{ère} IA (IVIA1) en jours ; B- Intervalle entre deux vêlages (IVV) en jours. (Idele, Fertilité des principales races laitières, 2015).

Depuis 2008 de plus en plus d'éleveurs utilisent des semences sexées, généralement pour l'IA1 (Institut d'élevage, Alice ; Fig7). Cette nouvelle technologie favorise la production de femelles, cependant le traitement de séparation des spermatozoïdes rend la semence 10 à 15% moins fécondante (Alice). Les progrès techniques tendent actuellement à diminuer l'effet du sexage.

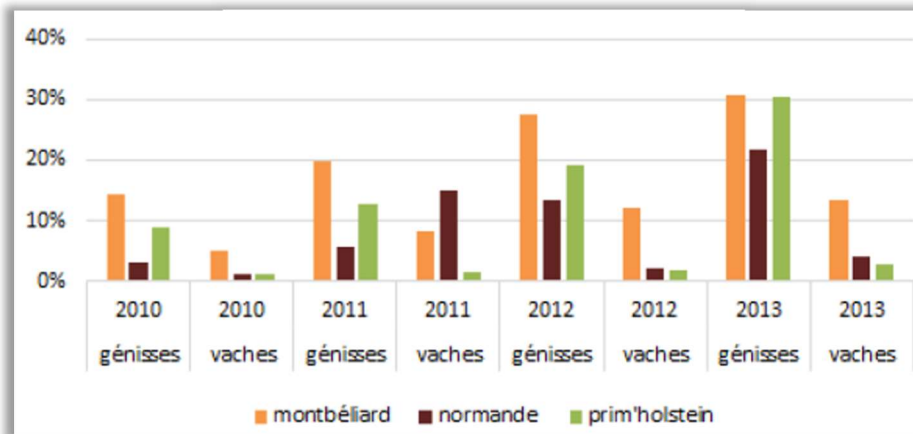


Figure 7 : Evolution de l'utilisation des semences sexées en fonction de la race et du statut de la femelle. Estimation selon les enregistrements SIG, Institut d'élevage – Alice. (Idele, Fertilité des principales races laitières, 2015).

Après plusieurs années de diminution inquiétante de la fertilité aussi bien sur le plan génétique que phénotypique, la situation se stabilise et tend à s'améliorer. Les causes d'infertilité en élevage bovin laitier sont multiples. On estime que, jusqu'au début des années 2000, 35-40% de la dégradation des performances de reproduction étaient due à la génétique. Aujourd'hui les experts estiment que le redressement génétique⁶ représente 50% de l'amélioration du taux de gestation (Institut d'élevage). L'index « fertilité » est désormais pris en compte dans la sélection des animaux (Fig 8), nous aurions donc pu nous attendre à une forte augmentation des taux de gestation. Cependant l'amélioration observée est moins importante qu'attendu. Cela nous laisse donc penser que l'environnement et les conditions d'élevage jouent un rôle prépondérant dans la réussite de la reproduction.

⁶ Redressement génétique grâce à la prise en compte de l'index « fertilité » lors de la sélection des animaux, aussi bien les femelles que les mâles.

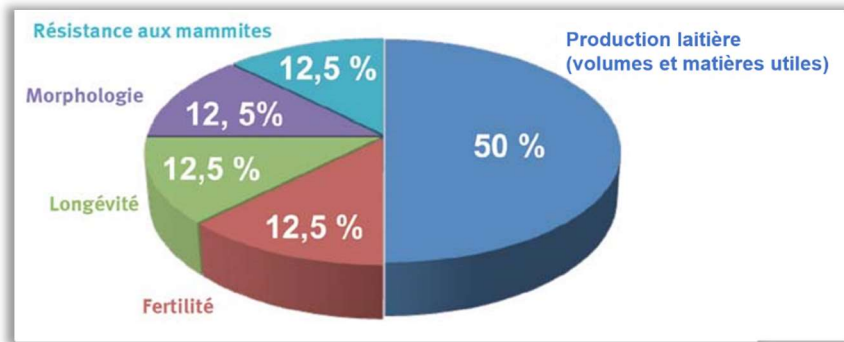


Figure 8 : Index global pour la sélection génétique – exemple de la race Prim'Holstein. Les index de valeur génétique sont choisis pour chaque caractère. L'index global ou ISU synthétise l'ensemble des critères selon une pondération spécifique à chaque race. (<http://france-genetique-elevage.org>).

En élevage bovin laitier, 30 à 50% des IA aboutissent à la naissance d'un veau (Evans and Walsh, 2012). Les échecs de gestation sont plus fréquents chez les vaches que chez les génisses. De plus ces évènements ont lieu majoritairement au cours des trois premières semaines de gestation soit pendant la période de reconnaissance maternelle de la gestation (Diskin and Morris, 2008). La réussite de la gestation est conditionnée par la capacité du conceptus à s'implanter puis se développer, mais également par la capacité de l'organisme maternel à supporter la gestation et à la mener à terme.

2. Le cycle sexuel chez les bovins

Chez les bovins, l'activité sexuelle débute à la puberté lorsque la génisse a atteint environ 40 à 45% de son poids adulte. Le cycle sexuel se caractérise par le déclenchement périodique de chaleurs appelées *œstrus* suivi d'une ovulation spontanée indépendamment de la présence du mâle (Roelofs *et al.*, 2010). L'espèce bovine est dite mono-ovulante et *polyœstrienne* c'est-à-dire qui présente plusieurs cycles œstraux au cours de l'année et n'est pas soumise à une reproduction saisonnière.

a. Le cycle œstral

Le cycle œstral dure en moyenne 21 à 22 jours chez les vaches mais seulement 20 jours chez les génisses (Bruyas, 1991). L'animal présente les premiers signes de chaleurs sous l'action des œstrogènes (Lyimo *et al.*, 2000) mais n'accepte pas immédiatement la monte. Vient alors l'*œstrus* qui dure 6 à 30 heures et est marqué par des changements comportementaux de l'animal (Fig. 3). La vulve est humide et enflée. L'animal est agité et cherche le contact avec ses congénères. Les comportements les plus facilement observables sont la monte des autres femelles et l'acceptation du chevauchement (Diskin and Sreenan, 2000).

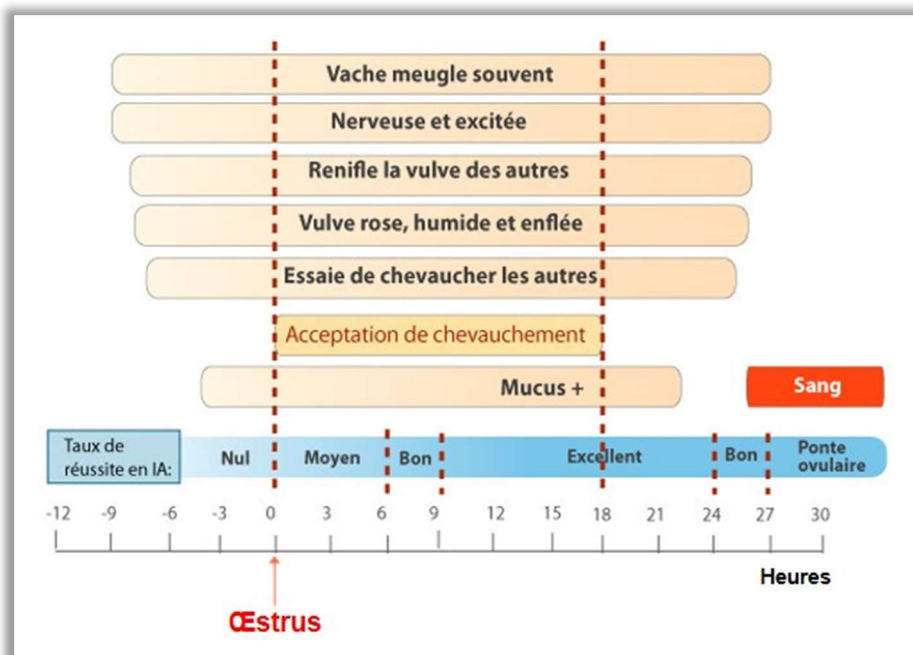


Figure 9 : L'œstrus chez les bovins – Comportement de l'animal et fenêtre d'insémination.

(adapté de <http://www.reproduction.com>).

Environ 8 à 12h après le début de l'*œstrus*, l'animal ovule et entre dans la phase appelée *metœstrus*. C'est au cours de cette phase que l'éleveur doit réaliser l'insémination artificielle (IA) afin de maximiser ses chances de réussite. Le corps jaune est alors formé et est pleinement actif au cours du *diœstrus*, période associée à la phase sécrétion de progestérone ou P4 (Mariens, 1993). Enfin en absence d'embryon le corps jaune va dégénérer et l'utérus congestionné va se relâcher (Lacerte, 2003). Le tractus génital de la femelle se prépare alors à l'entrée dans un nouveau cycle œstral (*proœstrus*).

b. Le cycle ovarien et son contrôle hormonal

L'ovaire est une glande *mixte* qui possède à la fois une activité *endocrine* de production des stéroïdes ovariens et une activité *exocrine* de production d'ovules. Le cycle ovarien débute par la phase *folliculaire* caractérisée par des vagues successives et continues de croissance folliculaire (Fig 10A ; Ireland *et al.*, 2000).

L'hormone folliculo-stimulante hypophysaire (ou *FSH*) induit tout d'abord le recrutement d'une cohorte de follicules de plus de 5 mm et assure leur croissance. La FSH stimule la conversion d'androgènes en œstrogènes dans les cellules de la thèque interne et de la granulosa (Saumande, 1991) ce qui conduit à l'apparition de récepteurs à l'hormone lutéinisante (ou *LH*) à la surface des cellules de la granulosa (Fig 10B). Le pic de FSH induit la production d'inhibine qui agit comme un rétro contrôle négatif sur la sécrétion de FSH. Il y a alors sélection du follicule ayant acquis suffisamment de récepteurs à la LH. Ce *follicule dominant* est le seul à poursuivre sa croissance grâce aux pulses de LH à haute fréquence et à l'augmentation de la biodisponibilité de facteurs de croissance tels que l'IGF1 (insulin growth factor-1). Enfin, lorsque le follicule a atteint une taille suffisante cela déclenche la décharge ovulante de LH et l'expulsion de l'ovocyte (Fig 10B). En ce qui concerne les follicules non sélectionnés, ils sont insensibles à la LH et ne peuvent plus croître. Ils présentent un défaut d'aromatation qui entraîne une carence en œstrogènes et une accumulation d'androgènes. L'ensemble de ces conditions conduit à leur dégradation par *atrésie* (Ireland *et al.*, 2000). Au cours d'un cycle de 21 jours, on dénombre 2 à 3 vagues folliculaires (Drion *et al.*, 1996). Si la vague a lieu en présence de progestérone ou P4 (*diœstrus*), la production de GnRH (Gonadotrophine Releasing Hormone) est inhibée et donc les décharges de LH sont de faible fréquence (Bruyas, 1991). Cela entraîne l'atrésie des follicules, l'augmentation de la FSH et l'initiation d'une nouvelle vague folliculaire.

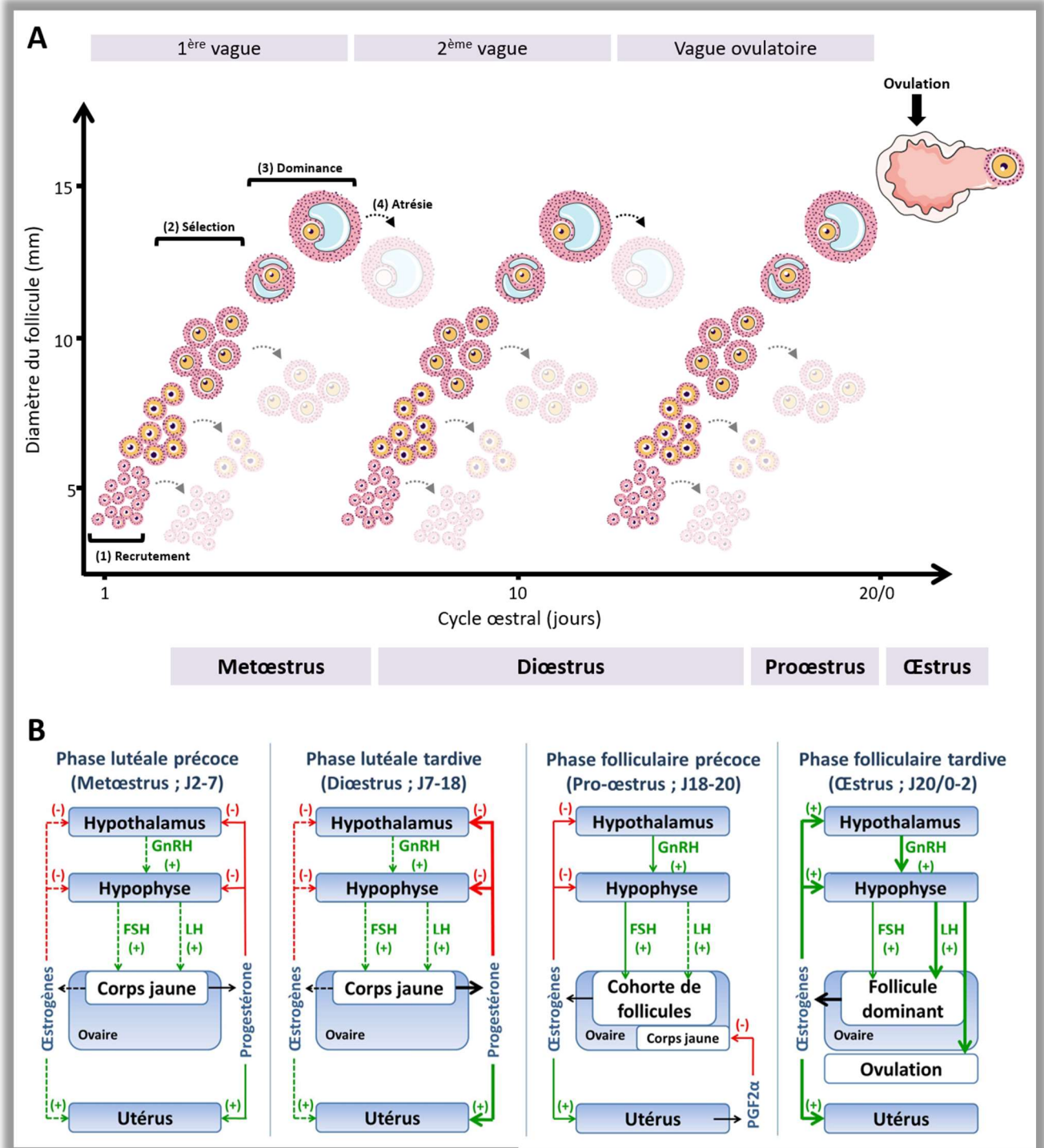


Figure 10 : Le cycle œstral chez l'espèce bovine. A- Vagues folliculaires au cours du cycle œstral bovin.

Les vagues folliculaires se décomposent en 4 phases : le recrutement (1) de la cohorte de follicules, la sélection (2) d'un follicule, la dominance (3) de celui-ci et enfin, en absence d'ovulation, l'atrésie (4). (d'après Ireland *et al.*, 2000) ; B- Récapitulatif des sécrétions hormonales et de leurs actions sur le tractus reproducteur femelle au cours du cycle œstral. Le cycle se décompose en quatre phases : Pro-œstrus (18 à 20 jpo), Cœstrus (de 0 à 2 jpo), Metœstrus (de 2 à 7 jpo) et Diœstrus (de 7 à 18 jpo). Les variations des flèches représentent les variations des taux de sécrétion des hormones. Dans l'ordre croissant de sécrétion : Flèches en pointillés < pleines < épaisses. Les flèches vertes représentent une activation et les rouges une inhibition. (A. Lesage-Padilla).

La *phase lutéale* débute après l'ovulation (Fig 10B). Au cours du metœstrus, la LH assure la transformation de la thèque interne et de la granulosa du follicule ovulé en corps jaune (Downey, 1980). L'activité sécrétrice du corps jaune est réduite pendant son développement. La production de P4 devient significative à partir du 5^{ème} jour post œstrus ou *jpo* (Downey, 1980). Il s'agit d'une période de forte croissance du tissu lutéal pendant laquelle le corps jaune double sa taille et son poids (Arosh *et al.*, 2002). La P4 agit sur l'utérus en diminuant la tonicité des cornes utérines et en stimulant le développement des glandes endométriales. En induisant la sécrétion d'*histotrophes*⁷, la P4 participe à la réceptivité utérine et donc à l'acceptation de l'embryon à l'implantation. L'œstradiol sécrété par les follicules conduit quant à lui à l'apparition des récepteurs à l'ocytocine (OXT) au sein de l'utérus.

En fin de phase lutéale (fin de dioœstrus) et en absence de gestation, les grandes cellules du corps jaune sécrètent l'OXT qui agit sur ses récepteurs utérins. Cela induit la production et la libération de prostaglandines par l'endomètre. La ProstaGlandine F2 α (PGF2 α) est synthétisée et sécrétée par l'endomètre en réponse à l'OXT produite par le corps jaune (Charpigny *et al.*, 1999). La PGF2 α stimule la régression du corps jaune ou *lutéolyse*, ce qui provoque une chute du taux de P4 circulante et la levée de l'inhibition de la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus (Mann *et al.*, 2001). Débute alors la phase folliculaire d'un nouveau cycle œstral. En cas de gestation, il y a persistance du corps jaune donc maintien de la sécrétion de P4 et arrêt des cycles œstraux. La lutéolyse a alors lieu juste avant le déclenchement de vêlage (environ 280 jours post fécondation).

⁷ Ensemble de substances nécessaires au développement et à la croissance de l'embryon (enzymes, hormones, cytokines, facteurs de croissance, ions, glucose, protéines de transport, d'adhésion, ...). Elles sont produites par les glandes endométriales sous l'influence de la progestérone (Spencer and Bazer, 2004)

3. La physiologie endométriale bovine

Le tractus reproducteur de la femelle est composé de deux ovaires, deux oviductes, un utérus, un vagin et une vulve (Fig 11A). Les ovaires sont le siège de l'ovulation et de la sécrétion des hormones stéroïdiennes. L'*oviducte* relie l'ovaire à l'utérus. Il permet à la fois l'arrivée des spermatozoïdes jusqu'à l'ovule mais aussi l'acheminement de l'embryon jusqu'à la cavité utérine. L'*utérus* permet l'établissement de la gestation en accueillant le conceptus de l'implantation jusqu'au vêlage. L'utérus bovin est bicorne avec un corps utérin de petite taille par rapport aux cornes (Guillomot, 2001). Il est composé de deux tissus majeurs : l'*endomètre* le tissu interne en contact direct avec la lumière utérine et le *myomètre* qui est la couche externe de tissu musculaire (Fig 11B). Le vagin et la vulve quant à eux jouent un rôle essentiel dans l'accouplement.

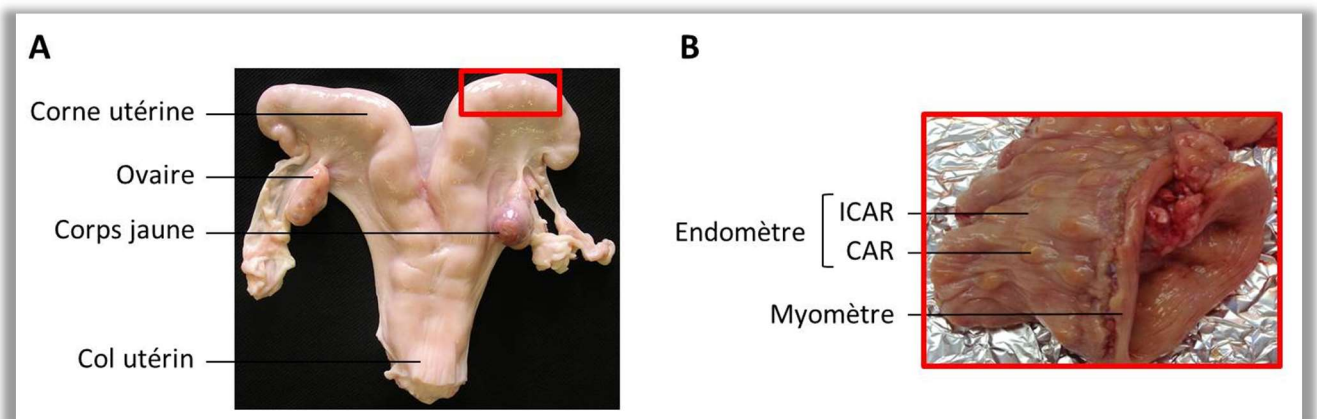


Figure 11 : Structure morphologique de l'utérus bovin. A- Photographie du tractus reproducteur bovin en vue dorsale ; B- Photographie d'une corne utérine bovine ouverte longitudinalement ; CAR = caroncule et ICAR = zone intercaronculaire.

a. La structure de l'endomètre bovin

D'un point de vue histologique, l'endomètre présente à sa surface une monocouche de *cellules épithéliales luminales* en contact avec la lumière utérine. Ces cellules forment une barrière contre les infections capable d'interagir avec les acteurs du système immunitaire inné (Oliveira *et al.*, 2012; Bauersachs and Wolf, 2013). Sous cet épithélium se trouve un stroma dense composé en majorité de *cellules fibroblastiques* mais aussi de cellules immunitaires et de vaisseaux sanguins (Fig 12). Dans le stroma profond les cellules fibroblastiques sont moins denses. Les *glandes épithéliales* présentent à la surface de

l'endomètre, i.e. proches de la lumière utérine, sont plus grosses et moins nombreuses que les glandes endométriales profondes.

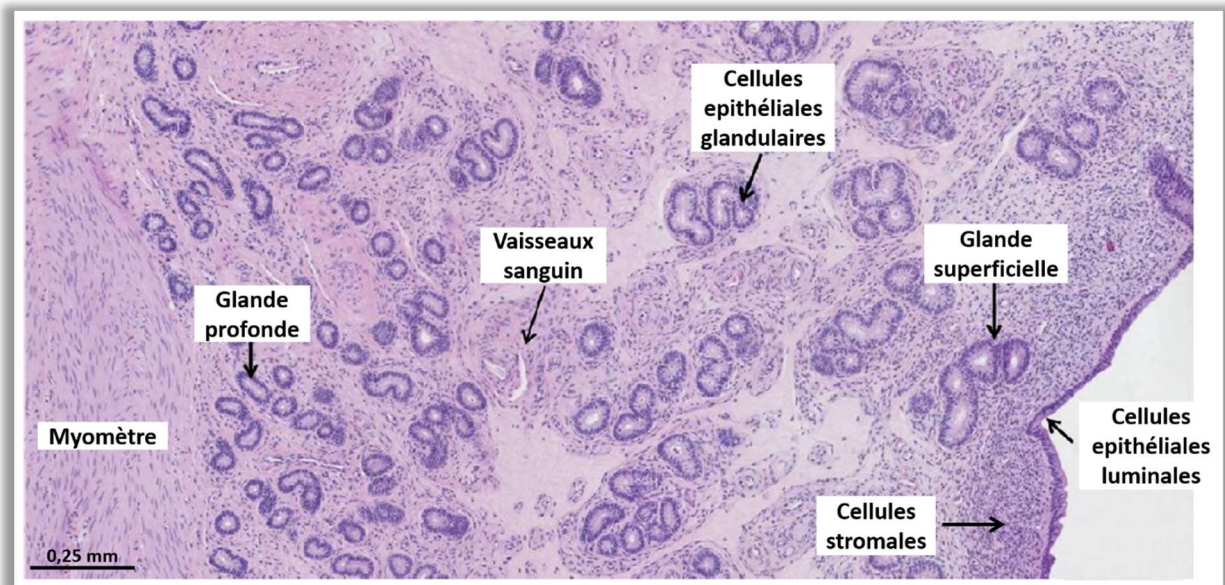


Figure 12 : Coupe transversale de corne utérine bovine. Coloration histologique à l'hématoxyline et à l'éosine ; Capture de l'image au Nanozoomer (C. Eozenou, thèse).

L'endomètre est un tissu complexe et régionalisé qui a un rôle critique dans la mise en place et la réussite de la gestation (Spencer *et al.*, 2012). A la surface de l'endomètre nous observons des structures concaves appelées *Caroncules*. Le tissu strié présent entre ces structures est appelé *Zone Intercaronculaire* (Fig 11).

Les caroncules (CAR)

Les caroncules sont les zones aglandulaires de l'endomètre et le siège de la placentation. Chez les bovins, la placentation est de type *synépithéliochoriale*. Le tissu extraembryonnaire n'envahit donc pas l'endomètre mais s'appose sur celui-ci (Guillomot, 1995). L'association des caroncules et des cotylédons embryonnaires permet la formation des placentomes (Fig 13). Ces unités placentaires permettent les échanges entre le fœtus et l'organisme maternel au cours de la gestation.

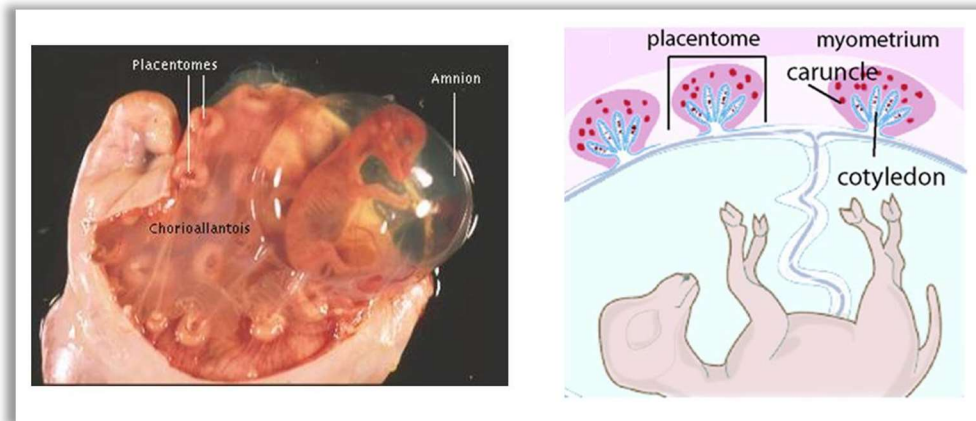


Figure 13 : Structure des placentomes bovins. La placentation bovine est de type synépithéliochoriale et comprend des structures en « bouton » appelées placentomes. Les placentomes sont constitués d'une caruncule (partie maternelle) et d'un cotylédon non invasif (partie fœtale).
(Adapté de Robbins and Bakardjiev, 2012 et Spencer *et al.*, 2012).

Les zones intercaronculaires (ICAR)

Les zones intercaronculaires sont composées de cellules stromales⁸ mais surtout des glandes endométriales. Ces glandes sécrètent les *histotrophes* c'est-à-dire des molécules de type enzymes, facteurs de croissance, ions, cytokines, etc. Les histotrophes sont indispensables à la croissance et au développement du conceptus (Embryon + annexes embryonnaires). En effet en absence de glandes endométriales, et par conséquent de sécrétion d'histotrophes, le conceptus n'est pas capable de s'allonger et dégénère (Gray *et al.*, 2002). Au cours de la gestation il n'y a pas de fusion des annexes embryonnaires avec les tissus ICAR, cependant il y a apposition et adhérence du trophoctoderme mais les conséquences de ces contacts ne sont pas encore connues (Guillomot, 1995).

⁸ Le stroma est composé essentiellement de fibroblastes mais également des cellules immunitaires.

b. Le transport des spermatozoïdes

Au cours du cycle œstral, le myomètre présente une activité contractile variable. En effet à l'œstrus, le péristaltisme myométrial est maximal aussi bien en fréquence qu'en amplitude (Langendijk *et al.*, 2002). L'augmentation des œstrogènes (E2) et de l'OXT au cours de la phase folliculaire agit directement sur l'activité utérine. La production d'E2 par l'ovaire entraîne une augmentation des récepteurs à l'OXT dans l'endomètre et donc une plus grande sensibilité à cette hormone (Okano and Okuda, 1996). La sécrétion pulsatile d'OXT permet alors la contraction du myomètre (Gilbert *et al.*, 1991). En cas d'entrée de sperme dans la lumière utérine, soit par monte naturelle soit par IA, les contractions utérines favorisent le transport des spermatozoïdes jusqu'à l'oviducte. Le plasma séminal est riche en OXT et participe lui aussi à la contraction de l'utérus (Goddard *et al.*, 1985; Watson *et al.*, 1999). Le sperme déclenche en parallèle une réponse inflammatoire de l'utérus (Kotilainen *et al.*, 1994; Nikolakopoulos and Watson, 1997). L'infiltration des leucocytes dans la cavité utérine permet l'élimination par phagocytose des spermatozoïdes immobiles, altérés ou morts (Suarez, 2014).

c. Le rôle des sécrétions utérines lors de la gestation précoce

Suite à l'arrivée des spermatozoïdes dans l'ampoule, la *fécondation* a lieu par fusion de l'ovocyte (gamète femelle) avec un spermatozoïde (gamète mâle). L'embryon est ainsi formé dans sa zone pellucide. Il entame alors sa migration à travers l'oviducte jusqu'à la lumière utérine tout en poursuivant les divisions cellulaires. (Spencer *et al.*, 2007 ; Fig 14).

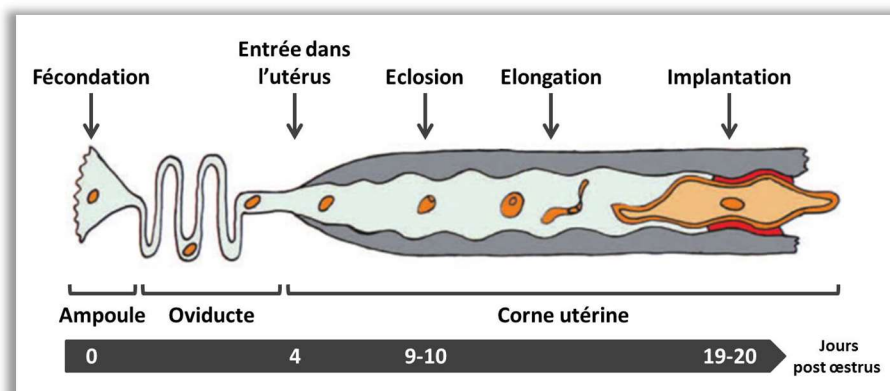


Figure 14 : Transport du conceptus bovin au cours de la gestation précoce. Après la fécondation, le conceptus migre à travers l'oviducte jusqu'à atteindre la lumière utérine. Il sort alors de sa zone pellucide (éclosion) afin de poursuivre son développement (adapté de Spencer *et al.*, 2007).

Dans l’oviducte, les cellules embryonnaires se compactent pour former la morula puis le blastocyste par cavitation (apparition du blastocœle) et différenciation du trophoctoderme et de la masse cellulaire interne. Le conceptus entre dans la lumière utérine à 4-5^{ème} jpo (Fig 15). La zone pellucide s’amincit et le blastocyste se dilate ce qui conduit à la rupture de l’enveloppe. Cette éclosion intervient environ à 9-10 jpo (Guillomot, 2001). Libéré des contraintes spatiales, le blastocyste bovin subit une phase de forte croissance du trophoctoderme caractéristique des ruminants jusqu’à l’obtention d’un long conceptus filamenteux prêt à s’implanter (Hue *et al.*, 2012).

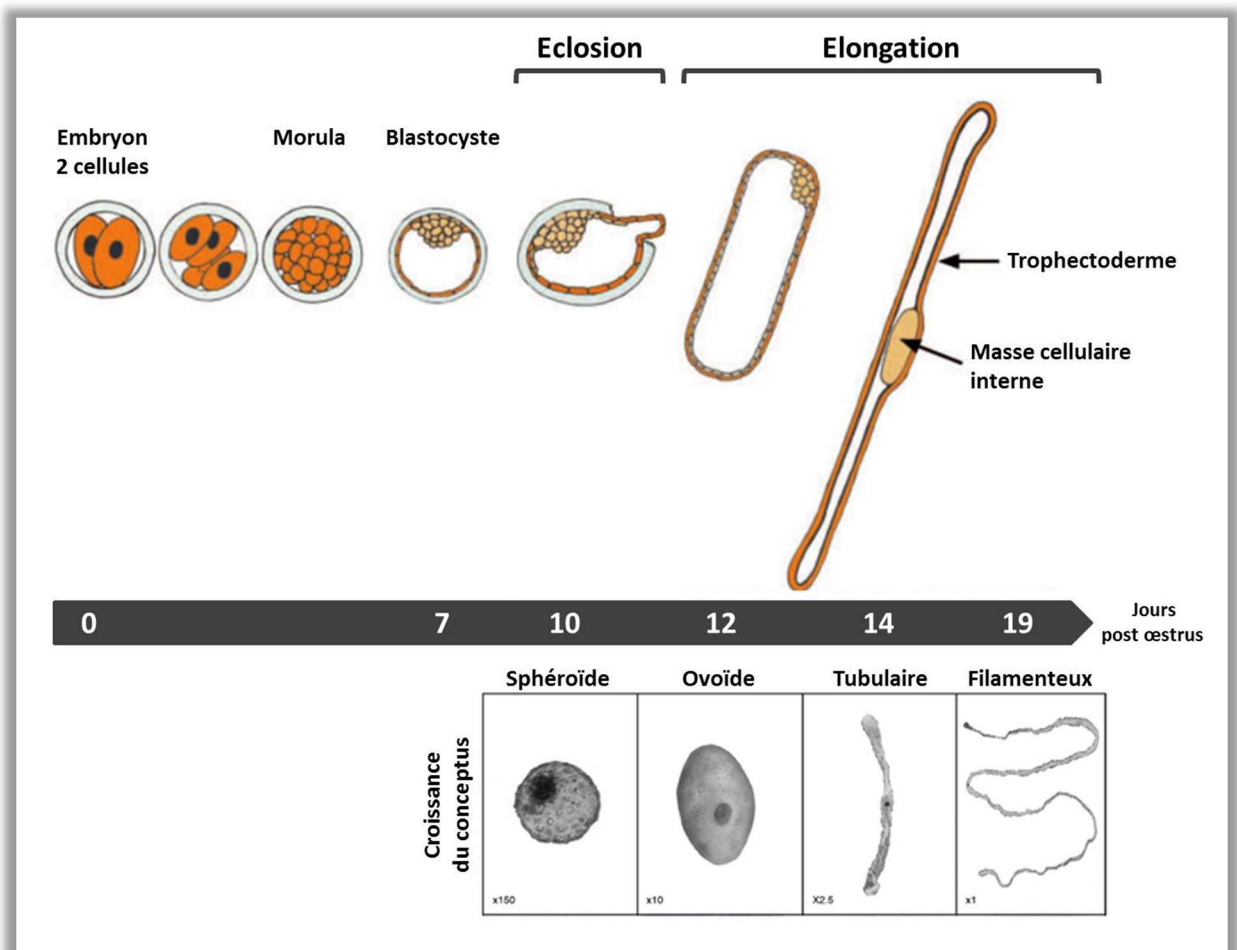


Figure 15 : Développement pré implantatoire du conceptus bovin. Les cellules embryonnaires se divisent au sein de la zone pellucide. Les cellules se compactent et forment la morula puis l’embryon se cavite et devient un blastocyste. Après l’éclosion, le trophoctoderme s’allonge jusqu’à former le conceptus filamenteux pré implantatoire (adapté de Spencer *et al.*, 2007 et Degrelle *et al.*, 2005).

Dès le III^{ème} siècle avant JC, Aristote avait émis l'idée selon laquelle la mère nourrissait son « petit » grâce aux sécrétions utérines. Mais c'est en 1882 que Bonnett montre le caractère indispensable de ces sécrétions pour le développement du conceptus chez les ruminants. En absence de glandes endométriales, le conceptus est capable d'éclore mais il n'y aura pas d'élongation. Cela entraîne des pertes embryonnaires au cours de la période pré implantatoire dues entre autre à un défaut d'expression des molécules d'adhérence (Gray *et al.*, 2002). Les glandes endométriales produisent et sécrètent une large gamme d'*histotrophes*. Ces nutriments sont essentiels au développement embryonnaire (Bazer *et al.*, 2012). Les acides aminés et les protéines tels que l'arginine et la SPP1 (secreted phosphoprotein 1) facilitent la prolifération cellulaire et le remodelage du cytosquelette. En modulant l'adhérence des cellules du trophoctoderme, cela permet leur migration et participe à l'élongation du conceptus (Bazer *et al.*, 2011).

De plus au cours de cette élongation, le métabolisme lipidique des cellules du trophoctoderme est fortement activé. Il favorise ainsi l'absorption et la synthèse d'acides gras. Les lipides accumulés dans les cellules épithéliales de l'endomètre au cours du dioestrus sont la principale source d'acides gras utilisés par le conceptus. Ces molécules ont des propriétés structurales et bioactives nécessaires pour son développement et son élongation. Leur export de l'endomètre vers le trophoctoderme se fait via des exosomes, des microvésicules, des protéines cargo ou encore des lipoprotéines (Ribeiro *et al.*, 2016). Actuellement, l'étape d'élongation du conceptus n'est pas réalisable *in vitro* et les embryons produits *in vitro* sont transférés *in utero* à 7^{ème} jpo. Les histotrophes sont essentiels au développement embryonnaire précoce chez tous les mammifères. Ils le sont d'autant plus chez les ruminants car l'implantation et la placentation sont relativement tardives (Carter, 2012). Le conceptus utilise ces histotrophes pour la nutrition, la régulation de l'homéostasie, la signalisation cellulaire et la production des signaux embryonnaires nécessaires au maintien de la gestation (Flechon *et al.*, 1986).

d. L'implantation embryonnaire

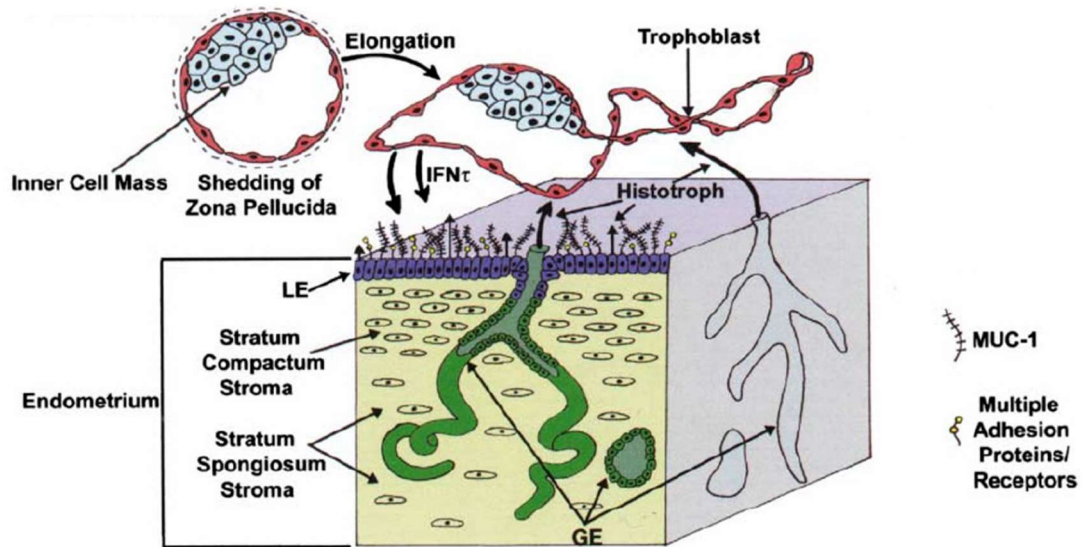
L'implantation se définit comme la mise en place d'interactions cellulaires permanentes entre un endomètre réceptif et un embryon compétent (Sandra *et al.*, 2011). C'est une étape critique de la gestation qui nécessite la synchronisation entre le développement embryonnaire et le cycle utérin. En cas de transfert embryonnaire, si le stade de développement des embryons diffère par rapport au stade physiologique de l'endomètre de la receveuse, la fenêtre implantatoire n'est pas respectée et cela entraîne l'échec de la gestation (Sandra *et al.*, 2015). Chez les bovins, l'implantation est tardive (19-20 jpo), le conceptus est donc libre dans la lumière utérine environ deux semaines. L'implantation est un processus qui se décompose en 4 étapes successives : l'orientation, l'apposition, l'adhérence et l'invasion. Chez les ruminants, la placentation est de type *synépithéliochoriale*. Il n'y donc pas d'invasion de l'endomètre maternel à proprement parlé.

Suite à l'éclosion, le trophoblaste⁹ met en place des interactions provisoires afin de s'ancrer à l'épithélium utérin : c'est l'*orientation* (Fig 16A). Les cellules trophoblastiques entrent dans une phase de forte division et participent ainsi à l'élongation. Les mécanismes sous-jacents sont méconnus cependant la mise en place de ces contacts transitoires semble essentielle à la croissance du tissu trophoblastique (Spencer *et al.*, 2004). Le conceptus, d'abord présent dans la corne ipsi latérale (au corps jaune), s'allonge jusqu'à atteindre la corne contra latérale au stade filamenteux (Rowson and Moor, 1966).

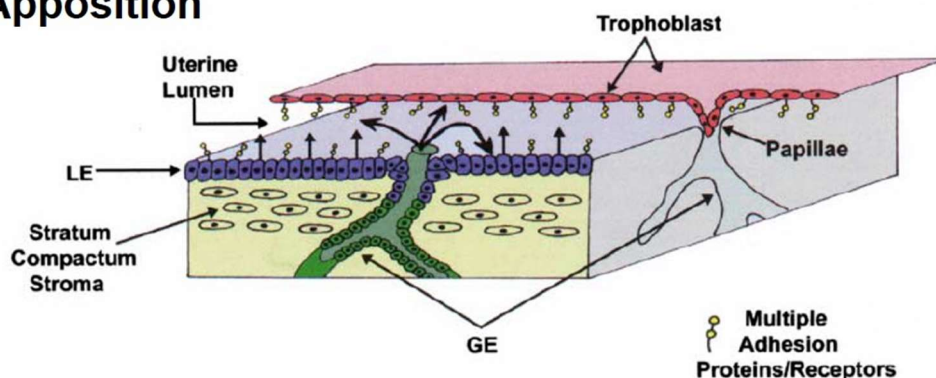
Débutent alors la phase d'*apposition* (Fig 16B) avec la formation de contacts rapprochés entre les membranes apicales des cellules trophoblastiques et épithéliales lumineuses (Guillomot, 1995). Au niveau des caroncules, il y a une interdigitation de ces membranes apicales. Dans les zones intercaronculaires, le trophoblaste envoie des projections cytoplasmiques à la surface des glandes endométriales superficielles (Guillomot *et al.*, 1981; Wooding, 1982). Ces projections temporaires permettent de stabiliser et d'ancrer le conceptus à la surface de l'endomètre. Ces interactions se mettent en place au niveau du bouton embryonnaire puis s'étendent de proche en proche le long du trophoblaste.

⁹ Le trophoblaste est la couche cellulaire externe du trophoctoderme en contact direct avec l'endomètre maternel.

A- Orientation



B- Apposition



C- Adhérence

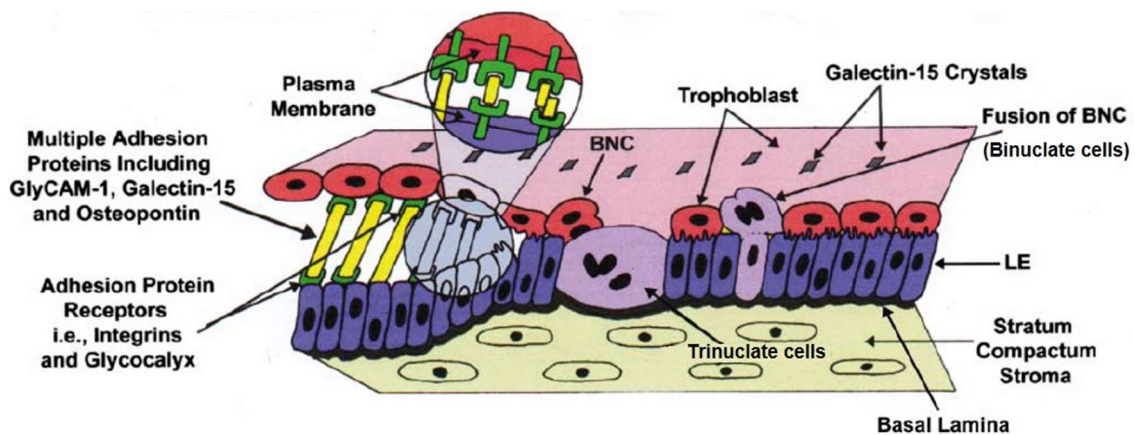


Figure 16 : Les grandes étapes de l'implantation chez les ruminants. L'implantation de type synépithéliochoriale se déroule en 3 phases : l'orientation du conceptus dans la lumière utérine, son apposition à la surface de l'endomètre ; et enfin l'adhérence (adapté de Spencer *et al.*, 2004).

La mise en place de l'*adhérence* du conceptus (Fig 16C) débute par la résorption du glycocalyx à la surface des cellules de l'épithélium luminal utérin puis la production de protéines spécifiques d'adhérence (Spencer *et al.*, 2004). Les interactions des molécules d'adhérence avec leurs récepteurs (présents à la surface de l'endomètre et du trophoctoderme) renforcent et stabilisent l'interaction entre le conceptus et l'endomètre. Il existe deux populations cellulaires au sein du trophoblaste. Les cellules *mononucléées* représentent environ 80% des cellules trophoblastiques et participent à l'adhérence. Les cellules *binucléées* quant à elles sont capables de migrer à travers l'épithélium luminal et de fusionner avec les cellules épithéliales lumineales pour former les cellules *trinucléées* à l'interface conceptus-endomètre (Wooding, 1982). Ce processus est spécifique des bovins : chez les petits ruminants (tels que la chèvre ou la brebis) les cellules binucléées fusionnent avec plusieurs cellules épithéliales utérines pour former des syncytiums de 20 à 25 noyaux (Guillomot, 2001).

Outre les interactions cellulaires entre le conceptus et l'endomètre, une véritable communication se met en place entre ces deux entités au cours de la gestation précoce.

4. La communication endomètre-conceptus au cours de la gestation précoce

a. La reconnaissance maternelle de la gestation : rôle de l'interféron Tau

Le conceptus bovin initie son élongation après l'éclosion dans la lumière utérine. Ce processus est accompagné d'une sécrétion d'interféron Tau (IFNT) par les cellules mononucléées du trophoblaste (Farin *et al.*, 1990; Morgan *et al.*, 1993). L'IFNT est le signal majeur de reconnaissance maternelle de la gestation. C'est un interféron de type I spécifique des ruminants et possédant une action antilutéolytique (Martal *et al.*, 1998; Roberts, 2007). L'IFNT sécrété dans la lumière utérine a une action paracrine sur les cellules utérines via ses récepteurs spécifiques (IFNAR1 et 2 ; récepteurs aux interférons α forme 1 et 2). Il y a alors inhibition des récepteurs à l'E2 (ESR) qui provoque à son tour l'inhibition de l'expression des récepteurs à l'OXT (OXTR, Demmers *et al.*, 2001). L'OXT alors produite par le corps jaune n'a plus d'effet sur les cellules endométriales et n'induit donc plus la libération de PGF2 α (Fig 17).

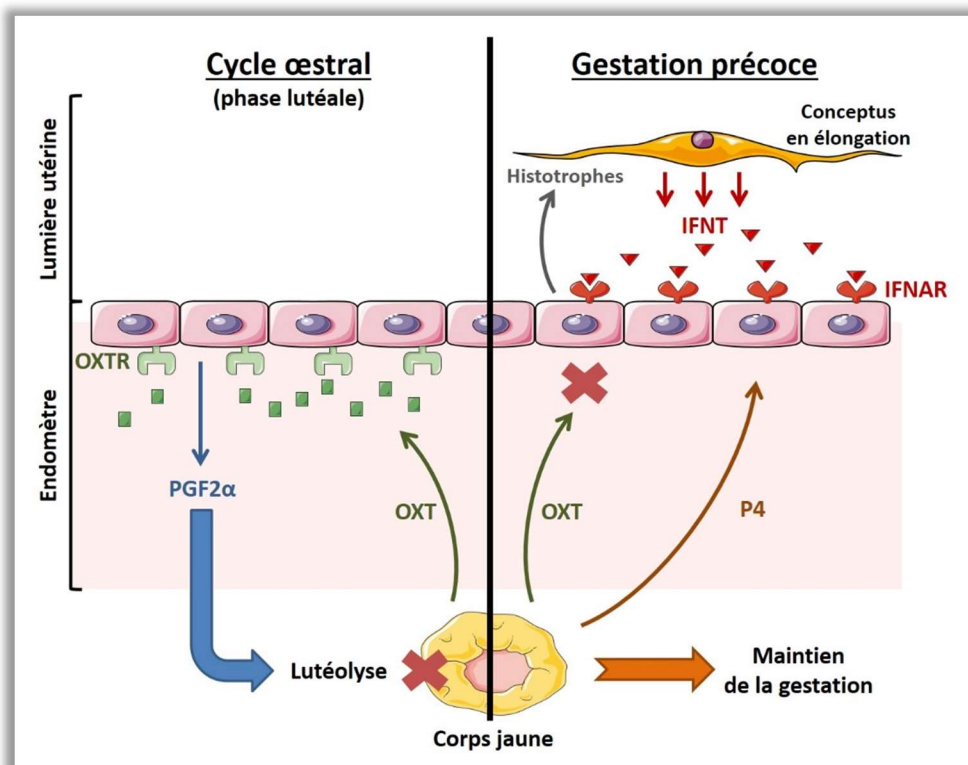


Figure 17 : Mécanisme d'action de l'interféron Tau au cours du cycle ou de la gestation précoce. Au cours de la phase lutéale tardive (gauche) ou de la période pré implantatoire (droite) soit 16 à 19 *jpo*. IFNT : interféron Tau ; IFNAR : récepteur aux interférons de type I ; OXT : ocytocine ; OXTR : récepteur à l'ocytocine ; PGF2 α : prostaglandine F2 α ; P4 : progestérone. (A. Lesage-Padilla ; d'après de Demmers *et al.*, 2001).

La sécrétion d'IFNT par le conceptus est détectable à partir du 12^{ème} jpo. Elle est maximale en période pré-implantatoire (16–19 jpo) puis diminue une fois l'implantation initiée jusqu'à devenir indétectable à 35 jpo. (Ealy and Yang, 2009). Outre son action antitutéolytique, l'IFNT possède des fonctions non spécifiques communes aux interférons de type I. Il participe notamment à la mise en place du statut immunitaire particulier de l'utérus au cours de la gestation pour permettre l'implantation du conceptus. L'IFNT a également une action antivirale et est un régulateur de l'apoptose et de la prolifération cellulaire (Stark *et al.*, 1998; Demmers *et al.*, 2001).

b. L'inflammation lors de la mise en place de la gestation

Le *système immunitaire* est défini par l'ensemble des mécanismes de défense mis en place par l'organisme pour lutter contre les agressions. Il a co-évolué avec le système reproducteur chez les vivipares (Sheldon *et al.*, 2014). Chez les mammifères, la gestation est une période particulière au cours de laquelle la femelle est dans un état transitoire de tolérance au conceptus. En effet celui-ci partage 50% de son génome avec la mère en cas d'insémination artificielle ou de monte naturelle, c'est donc une *greffe semi-allogénique* non rejetée pendant la période de la gestation. Lors du transfert d'un embryon celui est génétiquement différent de la mère. Dans une situation « normale » ce corps étranger serait rejeté et éliminé par l'organisme maternel. Au cours de la gestation il y a mise en place d'une tolérance de l'organisme maternel vis-à-vis du petit : c'est le *paradoxe immunologique* de la gestation (Gailly-Fabre *et al.*, 2015). Le système immunitaire est capable d'adapter sa réponse à la présence du conceptus.

L'inflammation est la réaction du système immunitaire qui assure le maintien de l'homéostasie des tissus au cours de changements physiologiques. C'est un processus nécessaire à la réussite de l'implantation. Cependant, s'il n'est pas contrôlé, il peut être à l'origine d'échecs de gestation. Au cours de la gestation précoce, les cellules immunitaires s'accumulent au sein de l'endomètre afin de préparer l'arrivée du conceptus. Ce processus met en jeu l'immunité adaptative qui induit l'immuno tolérance maternelle. Les gènes stimulés par l'interféron (ISG : Interferon Stimulated Genes) sont parmi les gènes les plus fortement régulés au cours de la gestation précoce, notamment à cause de la sécrétion trophoblastique d'IFNT. Les gènes *TAP1* et *TAP2* (peptide transporter) stimulent l'expression de *VEGF-C* (Vascular endothelial growth factor-c) qui protège les cellules

endothéliales et trophoblastiques de la cytotoxicité des cellules Natural Killer ou NK (Walker *et al.*, 2010). Les gènes *OAS1* et *2* (oligoadenylate synthetase) sont surexprimés, ils induisent l'expression et la sécrétion de l'ostéopontine (*OSP1*) par les lymphocytes T, les monocytes et les cellules NK. La *OSP1* stimule l'adhérence du conceptus, régule la cytotoxicité des cellules immunitaires et l'apoptose. L'immunité innée est également régulée pendant la gestation et elle permet de protéger l'endomètre des infections. Les gènes *MX1* et *MX2* sont stimulés par l'IFNT (Mansouri-Attia *et al.*, 2009a) et ont une action antivirale. Leur expression est maintenue jusqu'au 130-150^{ème} jour de gestation, période à laquelle le système immunitaire du fœtus est fonctionnel et prend le relais (Shirozu *et al.*, 2016)

c. Le contrôle hormonal de la gestation précoce

L'IFNT produit par le conceptus en élongation permet le maintien du corps jaune et donc de la production de P4 au cours de la gestation précoce. Cette hormone ovarienne agit sur l'endomètre via ses récepteurs membranaires (PGRM) ou nucléaires spécifiques (PGR). L'absence de ces récepteurs chez des souris KO entraîne une infertilité due à un défaut d'implantation embryonnaire (Lydon *et al.*, 1995). PGRA est la forme courte du récepteur nucléaire et a une action globalement inhibitrice alors que PGRB est la forme longue et agit plutôt comme un activateur de la prolifération cellulaire (Mulac-Jericevic, 2000). La P4 via le PGRA inhibe l'expression de la glycoprotéine de surface MUC1 (Mucin 1), une étape indispensable pour l'implantation (Brayman *et al.*, 2006).

La P4 module localement la réponse immunitaire. Elle freine le recrutement des leucocytes et des macrophages (Tibbetts *et al.*, 1999) et inhibe l'expression de composants du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). En outre, en coopérant avec l'IFNT, la P4 induit l'expression d'ISGs afin de réprimer la réponse immunitaire. En période pré implantatoire, cette action anti inflammatoire est nécessaire à la mise en place de la tolérance maternelle au conceptus (Bazer *et al.*, 2009). Enfin, la production de P4 permet d'activer les voies de signalisations paracrines nécessaires au maintien de la gestation en agissant sur le développement et la différenciation des glandes utérines. Il a été montré chez la brebis (Bartol *et al.*, 1988) puis plus récemment chez la souris (Stewart *et al.*, 2011) que la P4 participe à la formation des glandes endométriales en activant la

voie Wnt/ β caténine en période néonatale. A l'âge adulte ces glandes endométriales vont alors sécréter les histotrophes nécessaires à l'élongation et la survie du conceptus.

d. Le stress oxydatif au cours de la gestation précoce

Chez les organismes aérobiques, l'oxygène (O_2) est majoritairement métabolisé en H_2O par la mitochondrie, il permet la respiration cellulaire et la production d'ATP (Storey, 1996). Cependant environ 10% de cet O_2 est oxydé et participe à la production d'espèces réactives oxygénées (ROS) et azotées (Chance *et al.*, 1979). Ces radicaux libres participent à la signalisation cellulaire ainsi qu'à la mise en place de la réponse immunitaire (Schreck and Baeuerle, 1991; Chanock *et al.*, 1994). A haute dose ils deviennent toxiques. L'organisme les élimine donc par des voies de détoxification faisant intervenir notamment les enzymes antioxydantes : la catalase (CAT), les SODs (superoxyde dismutases) et les GPxs (Glutation peroxidases). Le *stress oxydatif* apparaît lorsque la production de ROS devient plus importante que la capacité de l'organisme à les éliminer.

Les ROS jouent un rôle clé dans la reproduction chez les mammifères. Ils sont produits dans le follicule au cours de l'ovulation et ainsi que dans le corps jaune lors de la synthèse des hormones stéroïdiennes (Fujii *et al.*, 2005). Lors de la fécondation, les ROS assurent le maintien d'un haut potentiel oxydo-réducteur au sein de l'ovocyte et permettent la formation du pronoyau mâle (Perreault *et al.*, 1984). Le conceptus émet un pic de ROS lors de l'initiation de l'implantation (Thomas *et al.*, 1997). Il semblerait que cette augmentation de ROS facilite également la perméabilisation des vaisseaux sanguins endométriaux murins (Laloraya *et al.*, 1989). La femelle produit localement des enzymes antioxydantes. Les souris n'exprimant pas *SOD1* (ou *Cu-Zn SOD*) sont infertiles car les embryons ne parviennent pas à s'implanter. En revanche les mères hétérozygotes sont fertiles et les embryons déplétés pour cette enzyme sont capables de se développer jusqu'au terme (Ho *et al.*, 1998). La femelle régule donc le niveau de ROS à l'interface entre l'endomètre et l'embryon en période péri implantatoire. Les ROS sont impliqués dans les mécanismes de prolifération cellulaire, de différenciation et d'apoptose. Le contrôle des radicaux libres par les mécanismes antioxydants est essentiel pour assurer le bon développement du conceptus. Chez la femme, la persistance du stress oxydatif après la formation du placenta entraîne des anomalies de développement et des retards de croissance intra utérin (Gupta *et al.*, 2007; Al-Gubory *et al.*, 2010).

L'activité des enzymes antioxydantes *SOD1*, *SOD2* (*Mn-SOD*) et *CAT* sont régulées au cours du cycle (œstral ou menstruel). Ainsi chez la brebis, l'expression des enzymes *SOD1* et *CAT* est inhibée par l'E2 dans les tissus CAR et ICAR (Al-Gubory *et al.*, 2008). *SOD2* n'est pas régulée par les hormones ovariennes pendant le cycle œstral. En période péri implantatoire, l'activité de *SOD2* est augmentée dans les tissus CAR et ICAR, alors que les activités de *SOD1* et *CAT* sont augmentées dans les CAR uniquement (Al-Gubory and Garrel, 2012; Al-Gubory *et al.*, 2016). Chez la femme, l'activité des enzymes antioxydantes augmente au cours de la phase proliférative (phase lutéale précoce) jusqu'à atteindre son maximum en phase sécrétoire (phase lutéale tardive) puis elle chute en phase folliculaire (Sugino *et al.*, 1996). En cas de gestation, l'expression des enzymes antioxydantes est maintenue au même niveau qu'en phase sécrétoire. *In vitro*, les expressions de *SOD1* et *SOD2* sont stimulées par la P4. L'E2 n'a pas d'effet seule mais elle agit en synergie avec la P4 et stimule *SOD1*. Enfin, dans l'espèce murine les enzymes antioxydantes sont régulées exclusivement par l'E2.

Les perturbations de l'environnement maternel lors de l'implantation (qu'elles soient d'origines métaboliques, immunologiques ou pharmacologiques) provoquent une augmentation du stress oxydatif et présentent un risque important à court et à long terme pour la santé du petit et de la mère. Les ROS peuvent en effet affecter la programmation ante natale via des mécanismes épigénétiques (Thompson and Al-Hasan, 2012). Ils peuvent avoir un effet délétère sur le métabolisme du conceptus en perturbant notamment les mitochondries. Elles sont en effet plus vulnérables au stress oxydatif car l'ADN mitochondrial n'est pas protégé par les histones et elles ne possèdent pas de mécanismes de réparation de l'ADN aussi performants que ceux du noyau (Alexeyev *et al.*, 2013). Bien que les ROS soient essentiels lors de la gestation précoce, le stress oxydatif est impliqué dans de nombreuses pathologies reproductives chez la femme telles que l'endométriose (Wang *et al.*, 1997), le syndrome de l'ovaire polykystique (POS, Palacio *et al.*, 2006; Victor *et al.*, 2011) ou la pré éclampsie (Gupta *et al.*, 2009).

5. Le gène *FOXL2* et son rôle dans la physiologie de la reproduction

a. Le rôle des facteurs FOX dans la reproduction

Les facteurs de transcription régulent des milliers de gènes cibles dans les cellules eucaryotes. Ils sont au cœur des réseaux de gènes et intègrent les signaux moléculaires extracellulaires. Les mutations naturelles ou les « knock-out » des facteurs de transcriptions provoquent des anomalies de division cellulaire ou d'organogenèse entraînant souvent la mortalité précoce de l'embryon. Les analyses transcriptomiques (microarray et RNA seq) ont mis en évidence l'expression de nombreux facteurs FOX (Forkhead box) dans l'endomètre des ruminants pendant le cycle œstral et la gestation précoce : *FOXA1*; *FOXA2*; *FOXA3*; *FOXC1*; *FOXF2*; *FOXI1*; *FOXL2*; *FOXO1A*; *FOXO4*; *FOXP1*; *FOXQ1* et *FOXS1* (Bauersachs *et al.*, 2006; Gray *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2006; Mitko *et al.*, 2008; Forde *et al.*, 2009, 2011; Shimizu *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2010; Bauersachs and Wolf, 2012; Cerri *et al.*, 2012).

Les facteurs FOX ont été découverts en 1989 comme appartenant à un réseau de gènes impliqués dans le phénotype « tête de fourche » ou « fork head » chez la drosophile (*Drosophila Melanogaster* ; Weigel *et al.*, 1989). Aujourd'hui plus de 2000 facteurs FOX ont été identifiés chez 108 espèces de champignons et d'animaux. La classification des facteurs FOX en fonction de la séquence d'acides aminés a permis de répartir les protéines FOX en 19 catégories de FOXA à FOXS (Hannenhalli and Kaestner, 2009). Il existe une grande variabilité des protéines FOX due à la dérive génétique, cependant le domaine de liaison à l'ADN est relativement conservé. Les facteurs FOX sont impliqués dans de nombreux processus de développement de la vie foetale jusqu'à l'âge adulte. Ils agissent comme des effecteurs terminaux de nombreuses voies de signalisation comme les voies Wnt/ β caténine, Shh (Sonic hedgehog), MAP Kinase et TGF- β (Transforming growth factor β ; Friedman and Kaestner, 2006; Hannenhalli and Kaestner, 2009; Nef and Vassalli, 2009; Georges *et al.*, 2011; Uhlenhaut and Treier, 2011).

Les facteurs FOX ont un rôle essentiel dans la physiologie de la reproduction chez la femelle (Benayoun *et al.*, 2011). Dans la glande mammaire, FOXA1 participe au développement des canaux et inhibe la différenciation terminale des alvéoles (Bernardo and Keri, 2012). C'est également un régulateur de l'expression de l'ESR et de l'AR (récepteurs aux androgènes ; Friedman and Kaestner, 2006; Katoh *et al.*, 2013). La

dérégulation de l'expression de *FOXA1* peut être à l'origine de cancers du sein hormono-dépendants. Les facteurs *FOXC1* et *FOXP1* peuvent être impliqués dans le développement de cancers du sein (Uhlenhaut and Treier, 2011; Wang *et al.*, 2012; Katoh *et al.*, 2013).

Dans l'ovaire, *Foxc1* participe à la migration des cellules germinales primordiales au cours du développement embryonnaire (Mattiske *et al.*, 2006) puis à la maturation des follicules à l'âge adulte (Uhlenhaut and Treier, 2011). Le facteur *Foxo1* est quant à lui régulé par la FSH et la LH, et participe à la synthèse de lipides et de stéroïdes ce qui suggère qu'il est impliqué dans la stéroïdogenèse (Hosaka *et al.*, 2004; Uhlenhaut and Treier, 2011). *Foxo3* est un inhibiteur de la croissance folliculaire, et lorsqu'il est déplété chez la souris on observe une insuffisance ovarienne précoce (Castrillon, 2003). Enfin *FOXL2* est un gène majeur de la fonction ovarienne. Ce point sera traité dans le paragraphe 5.c.

Enfin, les facteurs FOX semblent avoir un rôle crucial dans la fonction endométriale. *Foxa2* est exprimé exclusivement dans les glandes endométriales murines. Il participe au développement des glandes et est inhibé par l'E2. En cas de déplétion du gène *Foxa2*, on observe une diminution du nombre de glandes endométriales et des perturbations de l'implantation embryonnaire (Bazer *et al.*, 2010; Filant *et al.*, 2012). Chez les bovins, *FOXA2* est également régulé par l'E2 ce qui suggère une conservation de sa fonction (Shimizu *et al.*, 2010). Chez la femme et le babouin, l'expression du gène *FOXO1a* augmente dans l'endomètre pendant la phase lutéale et la gestation précoce sous l'effet de la P4 (Buzzio *et al.*, 2006). *Foxo1a* est impliqué dans le processus de décidualisation chez la souris (Takano *et al.*, 2007; Kohan *et al.*, 2010). Plus récemment *FOXL2* a été identifié dans l'endomètre bovin (Mansouri-Attia *et al.*, 2009b), humain (Governini *et al.*, 2014) et murin (Bellessort *et al.*, 2014) mais ce point sera également traité dans le paragraphe 5.c.

b. La découverte du gène *FOXL2*

Le gène *FOXL2* a été identifié en 2001 par clonage du locus 3q22-q23 dans le cadre d'une étude génétique de familles présentant un ou plusieurs membres atteints de BPES (Blepharophimosis-Ptois-Epicanthus inversus syndrome ; Crisponi *et al.*, 2001). C'est un gène mono exonique de 2,7 kb qui code pour un facteur de transcription de 376 acides aminés (AA) chez l'Homme (377 chez les bovins et 375 chez la souris). La séquence protéique de *FOXL2* présente une homologie de 90% chez les mammifères (Fig 18 ; Cocquet *et al.*, 2003).

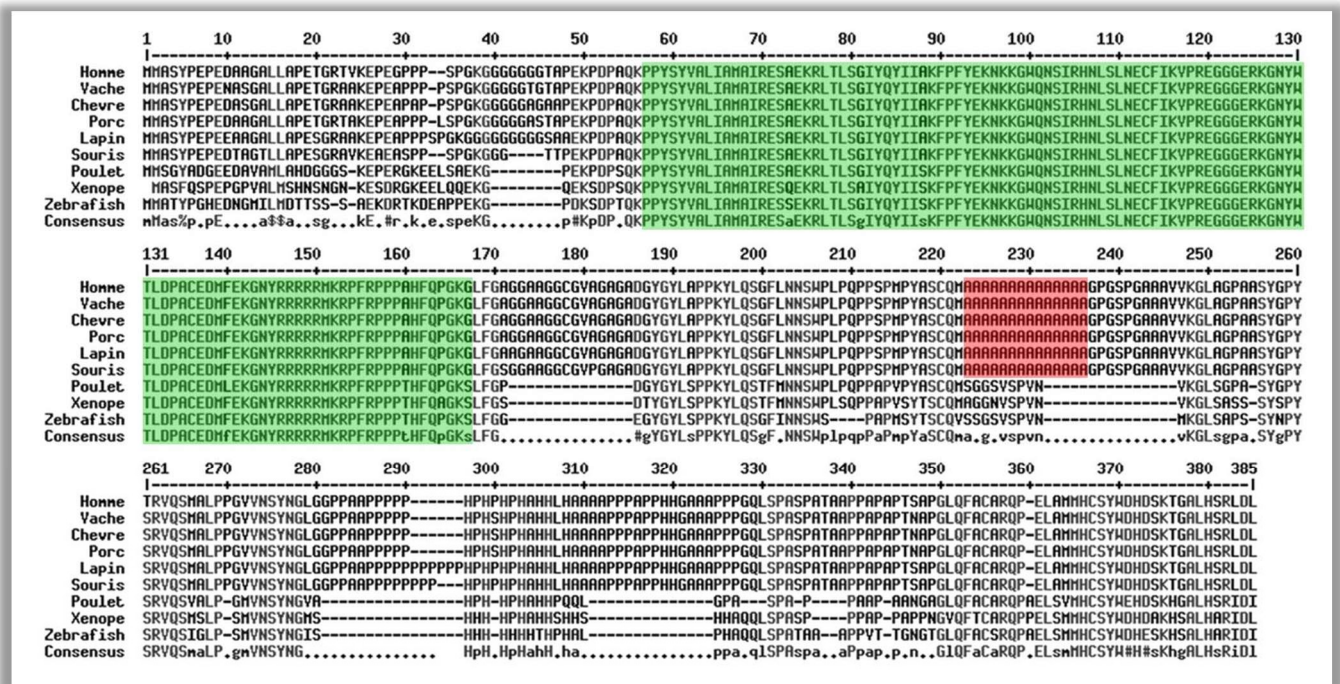


Figure 18 : Alignement de la séquence protéique de *FOXL2* chez les vertébrés. Séquences protéiques de l'Homme (*Homo Sapiens*), la vache (*Bos Taurus*), la chèvre (*Capra Hircus*), le porc (*Sus Scofa*), le lapin (*Oryctolagus Cuniculus*), la souris (*Mus Musculus*), le poulet (*Gallus Gallus*), le xénope (*Xenopus Laevis*) et le zébrafish (*Danio Rerio*) ; Le domaine forkhead fortement conservé est surligné en vert (95% d'homologie) et le domaine polyalanine spécifique des mammifères en rouge.

(A. Lesage-Padilla ; d'après Cocquet *et al.*, 2003).

Le gène *FOXL2* possède un domaine Forkhead de liaison à l'ADN de 110 AA fortement conservé chez les vertébrés (en vert dans les Fig 18 et 19), deux séquences de localisation nucléaire (ou NLS), et un domaine polyalanine présent uniquement chez les mammifères et codant pour 14 résidus alanine (en rouge dans les Fig 18 et 19) (Beysen *et al.*, 2009).

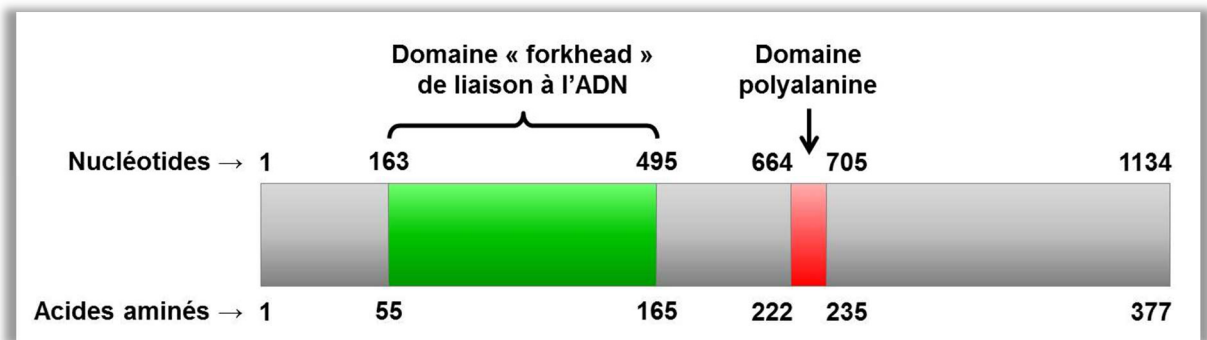


Figure 19 : Schéma de la structure du gène *FOXL2* bovin. Le gène *FOXL2* code pour une protéine de 377 AA. Le domaine est représenté en vert et le domaine polyalanine spécifique des mammifères en rouge (A. Lesage-Padilla ; adapté de Beysen *et al.*, 2009).

La partie N-terminale de la séquence nucléotidique est la moins conservée entre les taxons ce qui pourrait expliquer les variations fonctionnelles observables d'une espèce à l'autre. Néanmoins la structure tridimensionnelle globale de la protéine est fortement conservée chez l'ensemble des vertébrés (Cocquet *et al.*, 2002).

c. Le rôle de *FOXL2* dans la physiologie de la reproduction

Chez les mammifères, l'expression de *FOXL2* débute dès la période fœtale et se poursuit jusqu'à l'âge adulte. Elle est détectée dans le mésenchyme péri optique au cours du développement de l'œil aussi bien chez les mâles que chez les femelles. Sa mutation peut être à l'origine de malformations de la paupière (Uda *et al.*, 2004). En ce qui concerne le système reproducteur, l'expression de *FOXL2* est spécifique aux femelles. L'axe reproducteur peut être divisé en trois organes principaux : l'hypophyse, les ovaires et l'endomètre.

L'hypophyse

FOXL2 est un des premiers marqueurs exprimés au sein des cellules hypophysaires au cours de leur différenciation. Il est exprimé dans le lobe antérieur du stade fœtal jusqu'à l'âge adulte. Il agit à la fois comme un régulateur des fonction thyroïdienne et gonadotrope (Ellsworth *et al.*, 2006). Des études récentes chez la souris suggèrent que *Foxl2* serait un activateur de la production de gonadotropines. Il favoriserait notamment la liaison de Smad et de Pgr au promoteur de la sous-unité β de la FSH (Ghochani *et al.*, 2012). La FSH

composée de ses deux sous-unités est alors sécrétée par la glande hypophysaire et va agir sur l'ovaire.

L'ovaire

L'expression de *FOXL2* est détectée au cours du développement fœtal dans les gonades primitives, et plus particulièrement dans les cellules précurseurs de la granulosa, dès la régression des canaux de Wolf (Fig 20A). La différenciation de la gonade femelle est activée par *FOXL2* via la voie Wnt/ β -caténine (Nef and Vassalli, 2009). Chez la souris, *FOXL2* interagit avec *ESR* pour inhiber *Sox9* (SRY-box9). *FOXL2* et *ESR* bloquent *TESCO* une séquence activatrice du gène *Sox9* (Uhlenhaut *et al.*, 2009). Chez la chèvre en revanche, *FOXL2* semble inhiber les gènes « mâles » en réprimant l'expression de *DMRT1* (Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor 1 ; Elzaiat *et al.*, 2014).

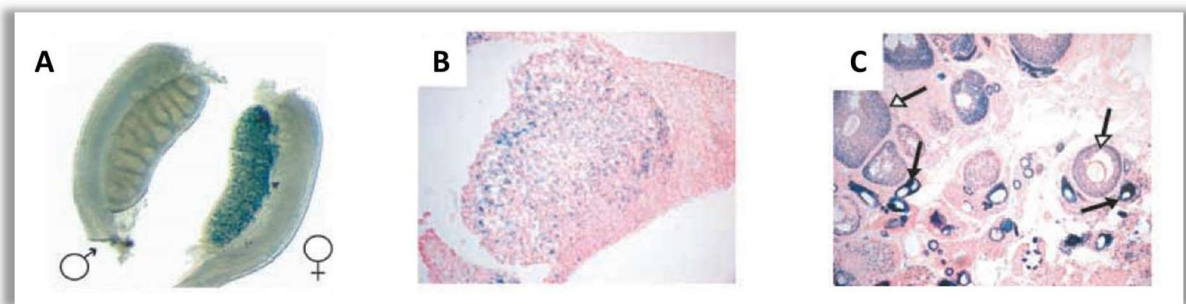


Figure 20 : Evolution de l'expression de *Foxl2* dans l'ovaire de souris. Le gène *Foxl2* est visualisé grâce à un système *LacZ* dans (A) les gonades primitives mâles et femelles à 12,5 jours post conception, (B) l'ovaire en maturation à la naissance et (C) les follicules en croissance dans l'ovaire adulte. A l'âge adulte, l'expression de *Foxl2* est plus importante dans les follicules précoces (flèches noires) puis elle diminue au cours de la maturation des follicules (flèches blanches). (d'après Schmidt *et al.*, 2004)

À la naissance, *FOXL2* est exprimé dans les cellules de la granulosa, c'est-à-dire les cellules somatiques de l'ovaire soutiens de la croissance ovocytaire (Fig20B, Schmidt, 2004). Il assure la différenciation et la prolifération des cellules de la granulosa. En absence de *FOXL2* chez la souris la croissance folliculaire est bloquée au stade primordial et l'ovocyte rentre en atresie par défaut de cellules de support (Uda *et al.*, 2004). Une fois adulte, l'expression de *FOXL2* permet le recrutement du follicule primordial puis elle diminue au cours de la folliculogenèse (Fig20C). *FOXL2* permet le maintien des cellules de la granulosa chez les femelles. En cas de délétion, les cellules somatiques ovariennes se mettent à exprimer des marqueurs « Sertoli-like » (Georges *et al.*, 2013a). Le profil

d'expression de *FOXL2* du stade fœtal jusqu'à l'âge adulte montre son importance dans la différenciation et le développement de l'ovaire. Cette fonction n'est d'ailleurs pas réservée aux mammifères puisque l'expression de *FOXL2* (ou de son homologue) est retrouvée dans les gonades de nombreux vertébrés (Geraldo *et al.*, 2013).

L'endomètre

L'analyse des transcrits endométriaux au cours du cycle menstruel a révélé l'expression de *FOXL2* en phase proliférative chez la femme (Talbi *et al.*, 2006). Son expression a été caractérisée pour la première fois dans l'endomètre de mammifère en 2012 chez les bovins (Eozenou *et al.*, 2012). Les expressions du transcrit et de la protéine *FOXL2* sont régulées au cours du cycle œstral et de la gestation précoce (Fig 21). *FOXL2* est augmenté en phase folliculaire (0 ou 20 jpo) et phase lutéale précoce (5 jpo). A l'inverse son expression est significativement diminuée en phase lutéale tardive (16 jpo) ainsi qu'en période péri implantatoire (16 et 20 jpo).

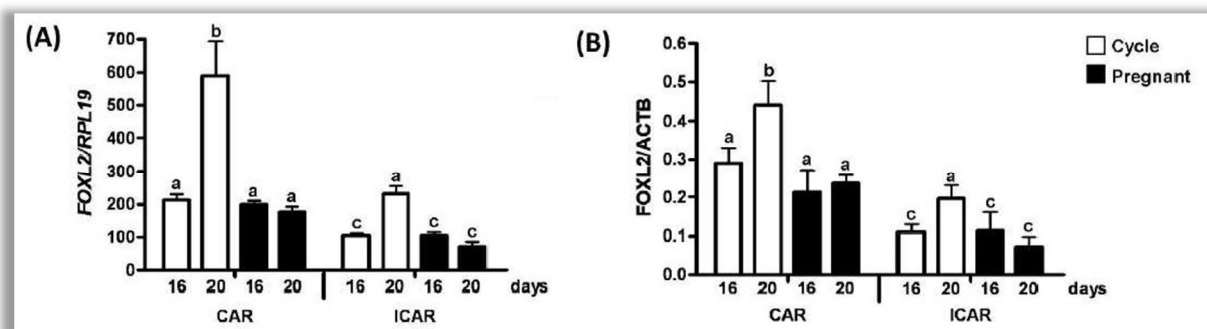


Figure 21 : Expression de *FOXL2* au cours du cycle et de la gestation précoce dans l'endomètre bovin. L'endomètre a été disséqué afin de séparer les zones CAR et ICAR à 16 et 20 jpo. (A) L'expression du gène *FOXL2* a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par *RPL19*. (B) L'expression de la protéine *FOXL2* a été quantifiée par Western blot et normalisée par l'actine B (*ACTB*) (Eozenou *et al.*, 2012)

Le niveau d'expression de *FOXL2* est globalement plus important dans les zones CAR par rapport aux ICAR. L'immunohistochimie montre qu'il est exprimé dans les cellules stromales ainsi que dans l'épithélium glandulaire mais qu'il est absent de l'épithélium luminal (Fig22). Au cours du cycle, dans les cellules épithéliales glandulaires (EG), *FOXL2* est cytoplasmique en phase folliculaire mais est nucléaire en phase lutéolytique. *FOXL2* étant un facteur de transcription son entrée dans le noyau est nécessaire pour agir sur ses

gènes cibles. La relocalisation de la protéine semble donc être un moyen de réguler son action dans les cellules EG entre les phases folliculaire et lutéale.

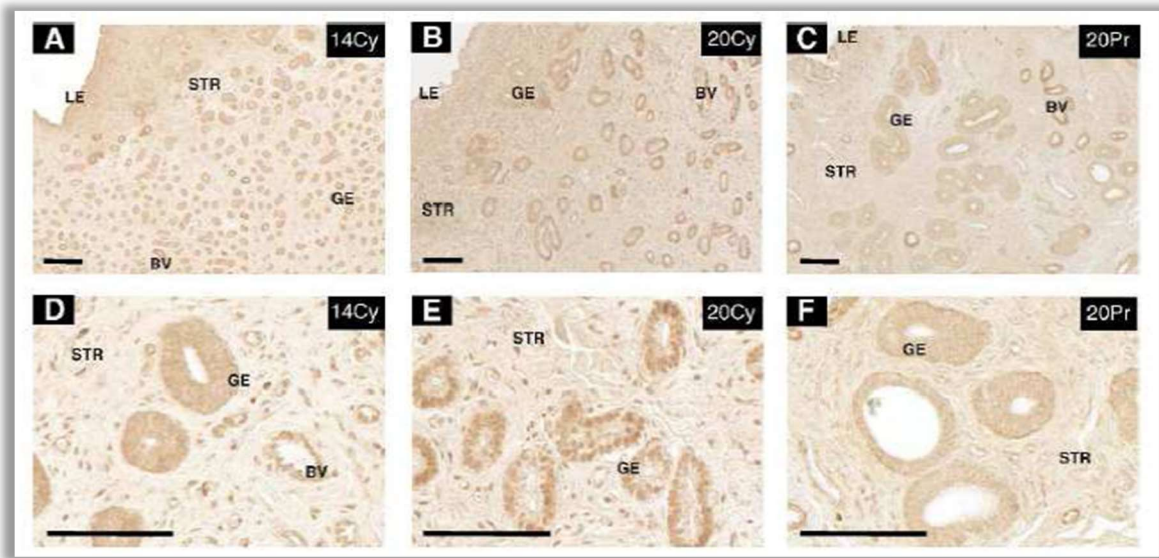


Figure 22 : Localisation de FOXL2 au cours du cycle œstral et à l'implantation dans l'endomètre bovin. L'immunohistochimie a été réalisée à partir d'échantillons endométriaux prélevés chez des Charolaises à 14 (A, D) et 20 jpo (B, E) du cycle œstral (Cy) ou à 20 jpo de gestation (Pr ; C, F). Les photos D, E et F sont des agrandissements des photos A, B et C. LE : épithélium luminal ; STR : stroma ; GE : épithélium glandulaire ; et BV : vaisseaux sanguins. (barre d'échelle = 100 μ m ; Eozenou *et al.*, 2012)

L'expression de *FOXL2* varie fortement entre le 20^{ème} jour de cycle et le 20^{ème} jour de gestation. Au 20^{ème} jour de cycle, l'animal est en phase folliculaire, le niveau de P4 a chuté et celui d'E2 est en train de remonter. Le 20^{ème} jour de gestation quant à lui correspond à l'implantation du conceptus. Le niveau de P4 circulante est maintenu, le niveau d'E2 est relativement faible et le conceptus sécrète l'IFNT. Dans l'endomètre bovin, l'expression de *FOXL2* n'est pas régulée par l'IFNT en revanche elle est inhibée par la P4 via ses récepteurs nucléaires PRA et PRB (Publication supplémentaire, C. Eozenou *et al.*).

Plus récemment, l'équipe de Giovanni Levi (Muséum d'Histoire Naturelle, Paris) a montré que *FOXL2* est exprimé dans le tractus reproducteur murin au cours du développement et jusqu'à l'âge adulte. A la naissance, le transcrit est présent dans le mésenchyme utérin puis lors de la maturation post natale de l'utérus l'expression de *Foxl2* est localisée dans le stroma, le myomètre ainsi que la gaine musculaire entourant les vaisseaux sanguins (Bellessort *et al.*, 2014). Une fois l'utérus formé, *FOXL2* n'est plus présent dans le myomètre. Il est intéressant de noter que chez la souris, *FOXL2* n'est pas exprimé dans les cellules épithéliales, qu'elles soient luminales ou glandulaires. Son

expression dans l'EG diffère donc entre les ruminants et les rongeurs. *FOXL2* est un gène crucial du système reproducteur de la femelle, les mutations du gène ou de ses séquences régulatrices sont à l'origine de pathologies chez l'Homme et d'anomalies de développement chez les animaux modèles.

d. Les mutations de *FOXL2* chez l'Homme

Le *Blepharophimosis-Ptosis-Epicanthus inversus syndrome (BPES)*

Le *BPES* est une maladie génétique rare qui touche environ 1/5000 naissances. C'est une pathologie héréditaire à caractère autosomique dominant cependant des cas sporadiques ont été rapportés. Les personnes atteintes présentent une dysplasie de la paupière supérieure (Blepharophimosis), des paupières tombantes (Ptosis) et un repli des paupières inférieures (Epicantus Inversus)(Fig 23, Crisponi *et al.*, 2001).

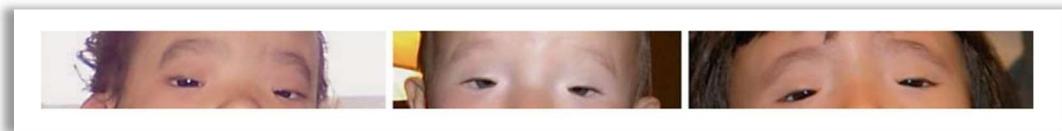


Figure 23 : Atteintes physiques des patients atteints de BPES. (Verdin & De Baere, 2012)

Les patients atteints de BPES de type I présentent uniquement les atteintes physiques alors que le BPES de type II est associé à une insuffisance ovarienne précoce (Zlotogora *et al.*, 1983). La majorité des patients possèdent une mutation du gène *FOXL2*. Les mutations faux-sens dans le domaine *forkhead* entraînent un défaut de localisation de la protéine et donc de son activité transcriptionnelle. Les mutations non-sens quant à elles entraînent une perte de fonction partielle ou totale (Beysen *et al.*, 2005; Moumné *et al.*, 2008a). Les mutations de type insertion/délétion sont observées chez 30% des patients atteints de BPES et entraînent notamment une expansion de la queue polyalanine.

Les tumeurs de la *granulosa*

Les tumeurs de la *granulosa* représentent environ 8% des cancers ovariens de l'adulte (Jamieson and Fuller, 2012). Elles sont composées majoritairement de cellules de la *granulosa* mais on peut retrouver ponctuellement des cellules de la thèque, des cellules lutéales ou encore des fibroblastes. Une mutation faux sens de *FOXL2* entraînant la

substitution d'un tryptophane par une cystéine a été identifiée comme responsable de plus de 90% des tumeurs de la granulosa (Shah *et al.*, 2009). Cette mutation conduit à une accélération de la prolifération cellulaire ainsi qu'à une diminution de l'apoptose. Tout comme les cellules de la granulosa en prolifération durant la phase folliculaire, les cellules tumorales expriment des récepteurs à FSH et synthétisent des E2 (Leung *et al.*, 2016). Cependant peu d'informations sont disponibles sur le rôle de FOXL2 dans la tumorigenèse.

L'endométriose

L'endométriose est une pathologie chronique qui touche environ 10% des femmes en âge de procréer. Au cours du cycle menstruel de la femme, l'endomètre s'épaissit au cours de la phase proliférative et est maximal en phase lutéale. En absence de fécondation, le corps jaune régresse et le tissu endométrial est éliminé pendant les menstruations. Chez les femmes atteintes d'endométriose, des cellules endométriales migrent via les trompes. Il se forme alors un tissu endométrial ectopique qui se développe hors de l'utérus et provoque des lésions, des adhérences ou encore des kystes dans les organes colonisés. Les patientes présentent une mutation du gène *FOXL2* (Borghese *et al.*, 2008) cependant son expression ne varie pas au cours du cycle dans l'endomètre par rapport aux femmes saines (Governini *et al.*, 2014). Le tissu ectopique en revanche présente une augmentation significative des transcrits *FOXL2* en corrélation avec l'activine A. Les cellules endométriales sont alors fortement prolifératives et réactives à l'inflammation.

e. Les mutations de *FOXL2* chez les animaux modèles

L'inactivation de *FOXL2* chez la souris

Les souris pour lesquelles le gène *Foxl2* est inactivé sur les deux allèles présentent une létalité de 95% avant le sevrage et donc l'atteinte de la maturité sexuelle. Parmi les survivants, les femelles sont stériles, leurs follicules sont bloqués au stade primordial et ne parviennent pas à mûrir (Schmidt, 2004). Les animaux présentent également de sévères malformations cranio faciales et un défaut de développement des paupières (Uda *et al.*, 2004). La concentration sérique d'IGF1 (Insuline Growth Factor) est diminuée et

entraîne une diminution de la taille des animaux ce qui suggère une anomalie de la fonction hypophysaire.

L'inactivation de *Foxl2* dans l'utérus murin entraîne une infertilité associée à un défaut d'implantation. L'organisation du tissu utérin est en effet fortement affectée. On observe une diminution du stroma, une hypertrophie du myomètre et une disparition de la couche musculaire autour des vaisseaux sanguins. *Foxl2* est donc un gène clé de la différenciation et de la maturation des tissus utérins chez la souris.

La mutation PIS chez la chèvre

Dès la fin du XIX^{ème} siècle, des vétérinaires ont rapporté des cas d'intersexualité chez la chèvre (Petit G., 1894). Le suivi des animaux a alors permis de montrer qu'ils présentaient également une absence de corne. Ce caractère est dû à la mutation d'un seul gène non identifié, il est autosomique et dominant aussi bien chez la femelle que chez le mâle. Les chèvres intersexuées sont toutes dépourvues de cornes. Ces deux caractères sont la conséquence d'une seule et même mutation alors baptisée P pour « Polled » (Asdell, 1944). En 1996, la région mutée a été identifiée et renommée PIS pour « Polled Intersex Syndrome » (Vaiman *et al.*, 1996). Il a ensuite été montré que le locus identifié est conservé chez l'Homme où des mutations sont à l'origine du BPES (Vaiman *et al.*, 1999). La mutation est une délétion d'une région non codante de 11,7 kb qui induit le silence transcriptionnel de *FOXL2* et des longs ARNs non codants associés (PFOXic, PISRT1 et PISRT2 ; Pailhoux *et al.*, 2001). La séquence régulatrice PIS se situe 300 kb en amont du gène *FOXL2*. Les femelles XX PIS -/- ne possèdent pas d'ovaire et les gonades se développent en testicules (Boulangier *et al.*, 2014).

f. Les gènes cibles de FOXL2

Les analyses transcriptomiques sur des modèles *vivo* et *vitro* ont permis d'identifier les gènes cibles régulés par FOXL2 dans l'hypophyse et l'ovaire.

Les cibles hypophysaires de FOXL2

L'étude des souris mutantes *Foxl2* *-/-* révèle une atrophie de l'hypophyse sans anomalie de différenciation des cellules gonadotropes, thyrotropes ni lactotropes (Justice *et al.*, 2011). L'analyse de ce modèle a montré que FOXL2 régule l'expression de plusieurs gènes hypophysaires et participe au contrôle de la gamétogenèse.

La GnRH régule la sécrétion des hormones gonadotrophines via son récepteur GnRHR (Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor). FOXL2 forme un complexe avec les protéines Smad3/4 et AP1 (Activator Protein 1), capable de se fixer sur la séquence régulatrice GRAS (GnRHR activating sequence) et d'activer l'expression du gène *Gnrhr* (Ellsworth *et al.*, 2003). *In vitro*, FOXL2 stimule également l'expression de *Cga* (glycoprotéine hormones, alpha polypeptide), le gène codant pour la sous-unité commune des hormones hypophysaires α GSU (Ellsworth *et al.*, 2006). Par ailleurs, dans les cellules gonadotropes FOXL2 potentialise l'effet activateur de la voie activine/TGF β via Smad3 et augmente l'expression de la follistatine (*Fst*). La FST régule la synthèse des sous-unités β de la LH et de la FSH (Blount *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2013). FOXL2 est donc un régulateur indirect de l'expression des sous-unités β des hormones gonadotrophines.

Les différentes études montrent que FOXL2 agit comme un activateur de l'expression de ses gènes cibles dans l'hypophyse. Il est important de noter que ces analyses ont été réalisées exclusivement *in vitro* et nécessiteraient d'être validées *in vivo*.

Les cibles ovariennes de FOXL2

Dans l'ovaire, FOXL2 est fortement impliqué dans les voies de biosynthèse des hormones stéroïdiennes. En effet *in vitro*, FOXL2 inhibe l'expression du gène codant pour la protéine STAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein). Celle-ci permet l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie, un préalable à la stéroïdogénèse (Pisarska *et al.*, 2004). *In vivo* le promoteur proximal *Star* présente plusieurs sites de liaison aux facteurs FOX. FOXL2 inhibe également l'expression de l'enzyme Cyp17 impliquée dans la synthèse des

androgènes faibles (Park *et al.*, 2010) et de l'enzyme Cyp26b1 qui dégrade l'acide rétinolique (Kashimada *et al.*, 2011). Enfin FOXL2 active l'expression de l'aromatase ou Cyp19 et donc la conversion des androgènes en E2 (Pannetier *et al.*, 2006). FOXL2 agit donc sur l'homéostasie du cholestérol et la stéroïdogénèse en inhibant la production d'androgènes d'un côté et en les convertissant en E2 de l'autre.

FOXL2 inhibe l'expression de gènes testiculaires. Au cours du développement fœtal, chez la souris, FOXL2 réprime l'expression de *Sf1* (splicing factor 1 ; Ikeda *et al.*, 1994). *In vitro* FOXL2 interagit directement avec le promoteur *Sf1* et inhibe par encombrement stérique son activation par WT1-KTS (Takasawa *et al.*, 2014). Lors du développement post natal de l'ovaire, FOXL2 inhibe l'expression de Sox9 en collaboration avec ESR1 chez la souris (Uhlenhaut *et al.*, 2009). En revanche chez la brebis, le blocage de l'expression des gènes « mâles » a lieu grâce à l'inhibition de *DMRT1* (Elzaïat *et al.*, 2014). FOXL2 est donc un facteur essentiel pour la détermination ovarienne. Il est impliqué dans la folliculogénèse par interaction avec NOBOX (oogenesis homeobox ; Bouilly *et al.*, 2014) et régule l'ovulation en agissant sur l'expression de *Ptgs2* (prostaglandin-endoperoxydase synthase 2 ; Batista *et al.*, 2007).

Les analyses transcriptomiques haut débit ont mis en évidence des fonctions biologiques régulées par FOXL2 dans l'ovaire (Fig 24). FOXL2 est impliqué dans le processus d'inflammation en modulant l'expression des *CCL* (C-C motif chemokine ligand) et des *CXCL* (chemokine C-X-C motif ligand). A noter que l'expression de *Ptgs2* est stimulée par FOXL2 dans les cellules KGN (Batista *et al.*, 2007) alors qu'elle est inhibée dans les cellules 293T (cellules rénales embryonnaires humaines dépourvues $E\alpha$) et MDA-MB-231 (cellules mammaires cancéreuses humaines dépourvues en $E\alpha$; Kim *et al.*, 2009). La régulation de *PTGS2* par FOXL2 dépend donc du contexte cellulaire et donc probablement des co-facteurs disponibles.

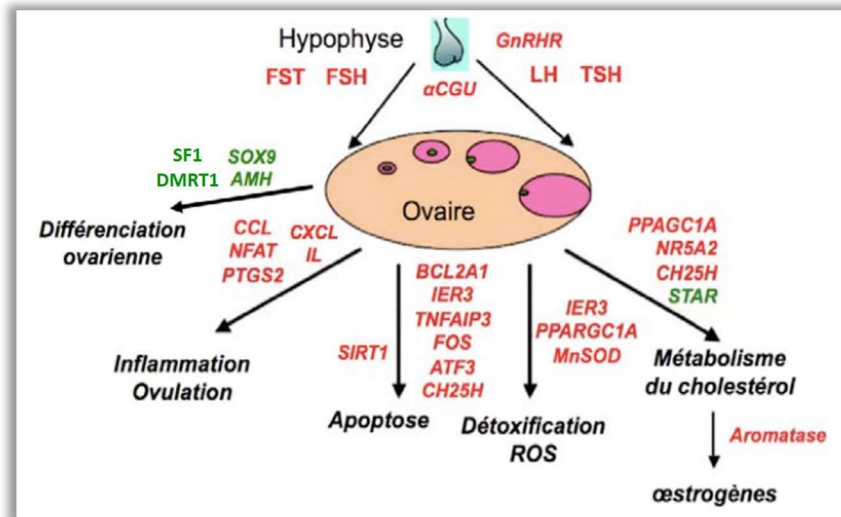


Figure 24 : Liste non exhaustive de cibles transcriptionnelles de FOXL2 dans l'hypophyse et les ovaires. FOXL2 régule la synthèse des gonatotrophines au niveau de l'hypophyse. Au niveau ovarien, FOXL2 régule quatre voies majeures : l'inflammation, l'apoptose, la détoxification des espèces réactives de l'oxygène et le métabolisme du cholestérol. Les cibles activées sont en rouge et les cibles inhibées sont en vert. (D'après B. Bellsort, thèse ; Batista et al. 2007 ; Benayoun et al. 2011).

Enfin, FOXL2 participe à la réponse au stress et à l'apoptose en modulant l'expression de *TNFAIP3* (tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3), *ATF3* (activating transcription factor 3), *FOS* (Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit), *SOD2* (MnSOD) et *BCL2A1* (B cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1). FOXL2 apparaît donc comme le gène majeur de la différenciation ovarienne au cours de la vie fœtale et du maintien de la fonction ovarienne à l'âge adulte (Uhlenhaut *et al.*, 2009; Georges *et al.*, 2013a).

De nombreux modèles ont été utilisés afin d'étudier les fonctions biologiques de FOXL2 dans l'hypophyse et dans l'ovaire chez différentes espèces. Cependant le rôle de FOXL2 dans l'endomètre est encore méconnu. Une partie de mes travaux de thèse visent donc à identifier les gènes cibles de FOXL2 dans l'endomètre bovin et de mettre en évidence les fonctions biologiques qui en découlent.

6. Les objectifs de la thèse

Chez les mammifères, la période péri-implantatoire est une phase critique au cours de laquelle se concentre une grande partie des échecs de gestation. Le déroulement de l'implantation influence fortement la mise en place, la progression et l'issue de la gestation mais aussi le développement du conceptus et sa programmation anté natale avec des conséquences pouvant apparaître à l'âge adulte. L'implantation est un processus complexe qui nécessite la coopération de deux entités distinctes : le conceptus et l'organisme maternel via l'endomètre.

Ma thèse a été préparée au sein de l'équipe « Environnement Maternel et Développement péri-Implantatoire » de l'UMR « Biologie du Développement et de la Reproduction ». Une des thématiques majeures de l'équipe d'accueil porte sur l'identification de voies de signalisations liées à l'implantation dans le cas de gestation normale ou perturbée. Le travail de thèse de C. Eozenou avait permis de mettre en évidence pour la première fois l'expression du gène *FOXL2* dans l'endomètre bovin ainsi que sa régulation au cours du cycle œstral. Cette étude a également montré que l'expression de *FOXL2* est régulée par la progestérone mais est indépendante de l'IFNT. *FOXL2* a par la suite été identifié dans l'endomètre humain et murin (Bellessort *et al.*, 2014; Governini *et al.*, 2014). Chez les ruminants, le conceptus reste libre dans la lumière utérine puis s'appose à l'endomètre à 20-21 jpo. Le processus d'implantation s'étend donc sur près de deux semaines, ce qui en fait un excellent modèle pour étudier les mécanismes moléculaires progressivement mis en jeu. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle *FOXL2* aurait un rôle clé dans la fonction utérine. Mon projet de thèse vise à déterminer dans un premier temps si la perturbation du métabolisme maternel lors de l'initiation de l'implantation affecte l'expression de gènes endométriaux d'intérêt parmi lesquels *FOXL2* ; puis à identifier les gènes cibles de *FOXL2* afin de déterminer les fonctions biologiques qu'il régule dans l'endomètre bovin.

Dans le cadre de ces deux études, j'ai été amenée à développer des cultures primaires de cellules endométriales bovines. A mon arrivée au sein du laboratoire, les cellules étaient dérivées à partir d'utérus entiers prélevés en abattoir après le sacrifice des animaux. L'absence d'information sur les donneuses, le manque de précision pour établir

le stade du cycle œstral, le rendement limité lors de la mise en culture ainsi que la difficulté à accéder à un abattoir, nous a amené à mettre en place des cultures primaires à partir de biopsies. Des cultures ont été dérivées à partir de tissus prélevés à différents stades du cycle œstral afin de déterminer le stade de prélèvement adapté pour nos études.

Nous avons ensuite utilisé un modèle expérimental développé par l'équipe de P. Lonergan (université de Dublin) de vaches primipares gestantes dont il est établi que le métabolisme est perturbé par la lactation. Les vaches en lactation présentent un bilan énergétique négatif qui impacte leurs performances reproductives. Ces femelles ont été comparées à des vaches tarées immédiatement après parturition et à des génisses. Par une approche gène candidat, nous avons ainsi montré que le tarissement conduit à une augmentation de l'expression endométriale de *FOXL2* et à une diminution de l'expression endométriale des enzymes antioxydantes. Ces variations sont associées à une amélioration du taux de gestation (Forde *et al.*, 2015). Dans cette étude, nous avons également étudié la régulation de l'expression des enzymes antioxydantes dans les cellules endométriales bovines (fibroblastes et épithéliales glandulaires) et montré qu'elles n'étaient pas régulées par l'IFNT ni par *FOXL2*.

Dans un deuxième temps, j'ai développé un modèle *in vitro* de cultures primaires de cellules endométriales bovines dérivées de biopsies endométriales prélevées sur des génisses Holstein synchronisées. J'ai ensuite testé et validé des conditions de transfection transitoire pour chaque type de cellules afin qu'elles expriment *FOXL2*. Les gènes cibles de *FOXL2* ont été identifiés par des analyses transcriptomiques sur la base d'une puce à oligonucléotides non commerciale puis une sélection de ces gènes a été validée par RT-qPCR (Real time – quantitative polymerase chain reaction). J'ai ainsi pu montrer que *FOXL2* régule les voies liées à la réponse immunitaire, le remaniement de la matrice extracellulaire (MEC), l'apoptose, la réponse au stress et la détermination du sexe. Cette analyse a permis de mettre en évidence de nouvelles fonctions biologiques régulées spécifiquement dans l'endomètre ainsi que des fonctions biologiques communes à celles régulées par *FOXL2* dans d'autres tissus tels que l'ovaire. Les données obtenues ont ensuite été replacées dans un contexte physiologique grâce à un modèle *in vivo* afin d'étudier l'évolution de l'expression de plusieurs gènes cibles en lien avec l'expression de *FOXL2* au cours du cycle œstral et de la gestation précoce.

PARTIE 1 :

Développement
d'un modèle *in vitro*
de cultures primaires
de cellules endométriales
bovines

1. Introduction

L'expression des gènes endométriaux est principalement régulée par l'E2 et la P4 au cours du cycle œstral, mais aussi par la P4, l'IFNT et la présence du conceptus au cours de la gestation précoce (Bauersachs and Wolf, 2012). Afin de comprendre les mécanismes moléculaires complexes mis en jeu dans la physiologie endométriale, de nombreuses analyses exploratoires (RNA seq ou microarray) ont été réalisées ces 20 dernières années (Fig 25).

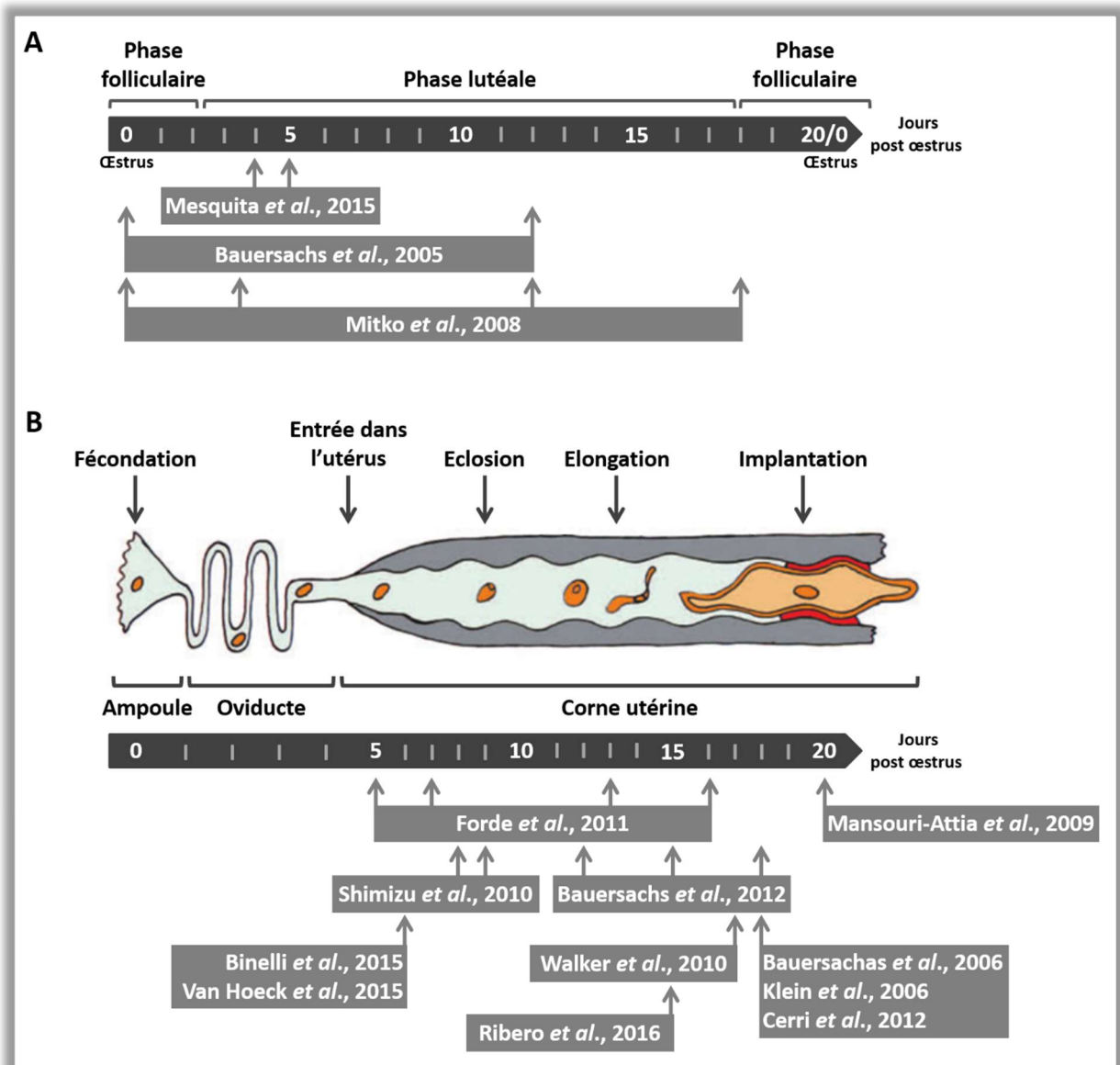


Figure 25 : Liste non exhaustive des analyses transcriptomiques de l'endomètre bovins. A- Analyses transcriptomiques des tissus endométriaux au cours du cycle œstral. B- Analyses transcriptomiques des tissus endométriaux au cours de la gestation précoce. (Adapté de O. Sandra).

Ces études ont montré que plusieurs centaines de gènes étaient différentiellement exprimés au cours du cycle œstral (Bauersachs *et al.*, 2005; Mitko *et al.*, 2008; Mesquita *et al.*, 2015 ; Fig 25A). A l'œstrus et sous l'influence de l'E2, on observe une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la *formation du cytosquelette*, la *mobilité des cellules*, le *remodelage de la matrice extracellulaire*, la *croissance cellulaire* et le *transport des ions et des nutriments*. En revanche en phase lutéale et en présence de P4, l'expression des gènes endométriaux associés à la *réponse immunitaire*, l'*angiogenèse* et l'*adhérence* est stimulée. Pendant la gestation précoce (Fig 25B), les analyses transcriptomiques ont mis en évidence d'une part la régulation de la *réponse immunitaire* participant à la tolérance maternelle (Bauersachs *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 2010; Cerri *et al.*, 2012), et d'autre part la régulation du *transport des acides gras et du glucose* nécessaire à la nutrition du conceptus (Forde *et al.*, 2011; Cerri *et al.*, 2012). Ces analyses transcriptomiques facilitent la compréhension de la physiologie endométriale, cependant elles ont été effectuées sur des échantillons de tissus endométriaux et comme nous l'avons vu précédemment, l'endomètre est un tissu complexe. Une telle approche met en évidence des variations transcriptomiques globales mais ne permet pas d'identifier les modifications spécifiques à chaque type cellulaire.

Les travaux de C. Eozenou ont montré que la protéine FOXL2 n'était pas présente dans l'épithélium luminal (Fig 22 ; Eozenou *et al.*, 2012). Dans le cadre de ma thèse, je me suis donc focalisée sur l'étude des deux principaux types de cellules endométriales bovines dans lesquelles *FOXL2* est exprimé : les fibroblastes et les cellules épithéliales glandulaires (EG). Lors de mon arrivée dans le laboratoire, des cultures primaires de fibroblastes et de cellules EG bovines avaient été mises en place. Les cellules étaient dérivées à partir d'utéri entiers récupérés en abattoir dans le but de développer un modèle *in vitro* de surexpression transitoire du gène *FOXL2* et d'identifier les gènes cibles de FOXL2 dans les cellules endométriales bovines.

Les cultures primaires de fibroblastes et de cellules EG étaient transfectées par électroporation. Le protocole de transfection transitoire a été mis au point à l'aide du plasmide GFPmax codant pour la GFP (Green fluorescent protein). Le noyau des cellules étaient marqué au DAPI. Le taux de transfection était alors estimé par comptage manuel du nombre de cellules GFP positives rapporté au nombre de noyaux. En moyenne 41,1%

des fibroblastes étaient transfectés cependant la transfection par électroporation est peu reproductible et le taux de transfection variait de 16 à 68%. Les cellules EG quant à elles sont particulièrement difficiles à transfecter et le taux de transfection n'excédait pas 12%. L'électroporation entraîne une forte mortalité cellulaire pouvant atteindre 70% dans les cellules EG. Malgré tous ces inconvénients, lors de la thèse de C. Eozenou, la transfection par électroporation restait l'approche la plus efficace pour surexprimer *FOXL2* dans les cellules endométriales bovines.

En tant que facteur de transcription, *FOXL2* régule l'expression de plusieurs centaines de gènes dans l'hypophyse (Ellsworth *et al.*, 2003, 2006; Blount *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2013) et dans l'ovaire (Batista *et al.*, 2007; Moumné *et al.*, 2008b; Uhlenhaut *et al.*, 2009). La comparaison *in silico* du transcriptome endométrial bovin à 20 jpo (cycle vs gestation ; Mansouri-Attia *et al.*, 2009b) et des gènes différentiellement exprimés lors de la surexpression de *FOXL2* dans les cellules KGN (Batista *et al.*, 2007) a permis d'identifier 38 gènes régulés par *FOXL2* dans les KGN et exprimés dans l'endomètre bovin (Fig 26).

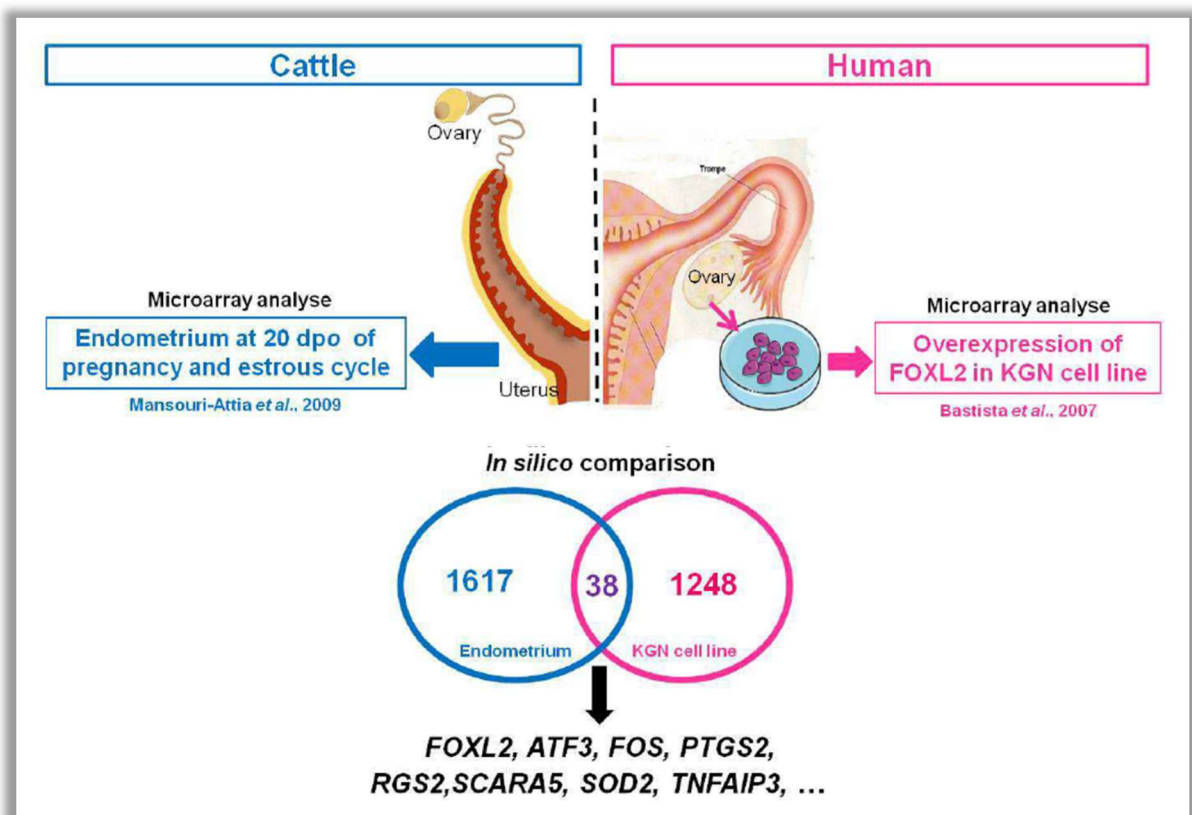


Figure 26 : Comparaison *in silico* des gènes orthologues entre l'endomètre bovin et les cellules KGN surexprimant *FOXL2*. (Liste complète des gènes en annexe 1.a ; thèse C. Eozenou)

Sur la base de cette étude comparative, une sélection de gènes a été analysée par RT-qPCR dans les cultures primaires de cellules endométriales surexprimant transitoirement *FOXL2* : *ATF3*, *FOS*, *PTGS2*, *RGS2*, *RGS2*, *SCARA5*, *SOD2* et *TNFAIP3*. L'expression des gènes *DLX5*, *HOXA10*, *PGR* et *RSAD2* a été analysée en complément (Fig 27).

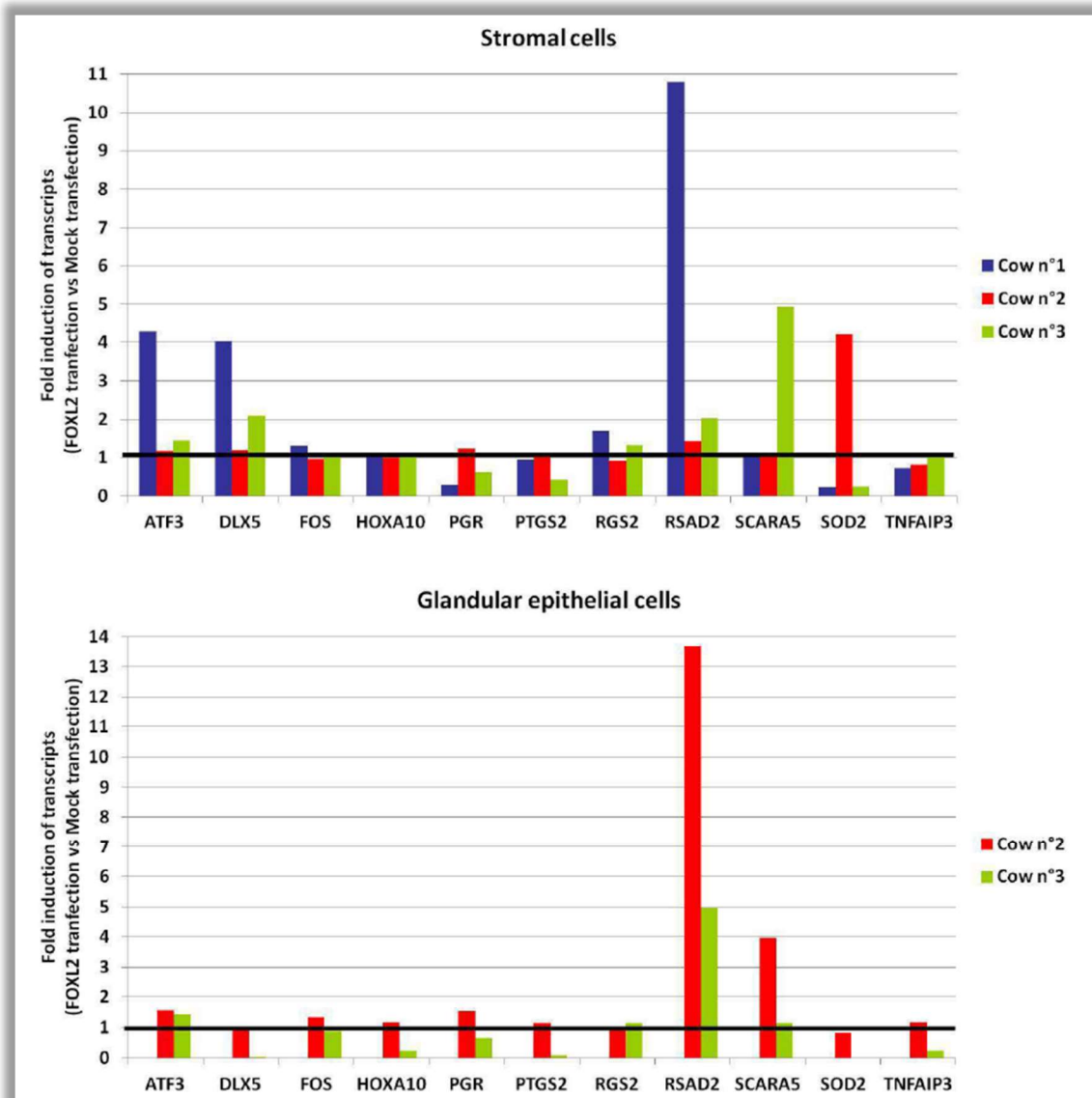


Figure 27 : Expression des gènes cibles putatifs de FOXL2 dans les fibroblastes et les cellules épithéliales glandulaires. L'expression des transcrits est représentée sous forme de ratio d'expression dans les cellules transfectées avec le plasmide *FOXL2* par rapport aux cellules transfectées avec le plasmide vide (pSG5) afin de masquer l'effet de l'électroporation sur leur expression. Les cultures ont été dérivées à partir de 3 utéri distincts prélevés en pleine phase lutéale mais les cellules EG n'ont pas été obtenues pour l'animal 1 (Thèse C.Eozenou).

L'analyse des transcrits montre une réponse hétérogène des cellules issues d'animaux différents. Les fibroblastes de l'animal n°2 notamment réagissent différemment à la surexpression de *FOXL2* et la régulation des gènes cibles est inversée par rapport à celle

observée dans les fibroblastes issus des animaux 1 et 3. L'expression de *SOD2* par exemple est fortement réprimée par *FOXL2* chez les vaches 1 et 3 alors qu'elle est stimulée chez la vache 2. Les cellules EG présentent également une forte hétérogénéité de réponse entre les deux animaux disponibles. Cette analyse préliminaire montre une régulation de l'expression de certains gènes cibles mais le faible taux de transfection et l'hétérogénéité de la réponse des cellules limitent l'interprétation de ces résultats.

Les cultures primaires ont été transfectées par électroporation. Pour les cellules fibroblastiques, cette technique était le meilleur compromis avec un taux de transfection élevé (41,1%) et une mortalité cellulaire modérée. En revanche, pour les cellules EG la transfection par électroporation est peu efficace (4 à 12%) et entraîne une forte mortalité cellulaire. Il est donc nécessaire d'améliorer l'efficacité de transfection soit en optimisant le protocole d'électroporation soit en utilisant un autre système de transfection.

De plus les cultures primaires ont été dérivées à partir d'utéri de vaches provenant d'abattoir et sélectionnés sur la morphologie du tractus génital et du corps jaune (Arosh *et al.*, 2002). Les animaux ainsi sélectionnés étaient tous en phase lutéale. Cependant la taille et le poids du corps jaune ont révélé que l'animal 1 était en phase lutéale tardive alors que l'animal 2 était en phase lutéale précoce et l'animal 3 en milieu de phase lutéal. Cette variation du stade de prélèvement des animaux peut être à l'origine des variations de réponses des cellules. Il semble donc essentiel de dériver des cultures primaires à partir d'organes prélevés au même stade du cycle œstral. L'utilisation des utéri déchets d'abattoir ne permet pas de définir précisément le stade physiologique de l'animal. Cette approche nécessitera donc l'utilisation de matériel biologique issu de femelles synchronisées et prélevées à un stade défini. Sachant que l'expression de *FOXL2* dans l'endomètre bovin est plus faible au cours de la phase lutéale tardive (Eozenou *et al.*, 2012) et dans le but de surexprimer *FOXL2* dans les cellules endométriales, il semble que le prélèvement en phase lutéale serait le plus adapté pour observer une variation de l'expression des gènes cibles. Cette hypothèse mérite cependant d'être validée afin de raffiner le protocole. Enfin, sur le modèle de ce qui est couramment pratiqué en médecine humaine, nous allons développer des cultures primaires de cellules endométriales à partir de biopsies utérines bovines et déterminer dans quelle mesure ces cultures sont utilisables pour le développement de protocoles expérimentaux.

2. Mise en place des cultures primaires de cellules endométriales bovines à partir de biopsies

Les cultures primaires étaient dérivées antérieurement à partir d'utérus entiers selon un procédé utilisé au laboratoire (Mansouri-Attia *et al.*, 2009b) à partir d'animaux d'exploitations agricoles euthanasiés en abattoirs de province (Vendôme, 41 Val de Loire ; Migennes, 89 Yonne ; ...) avec lesquels des conventions de prélèvement d'organes ont été signées avec l'INRA. Dans ces conditions, peu de renseignements étaient disponibles sur l'animal (génétique, alimentation, âge, statut physiologique, nombre de gestation, statut sanitaire, etc.). En de rares occasions nous avons pu disposer d'animaux expérimentaux intégrés dans des programmes de recherche collaboratifs.

a. Le prélèvement de l'endomètre

Les tractus génitaux issus des déchets d'abattoir étaient sélectionnés au stade diœstrus sur la morphologie et la couleur du corps jaune (Fig 28 ; Arosh *et al.*, 2002).

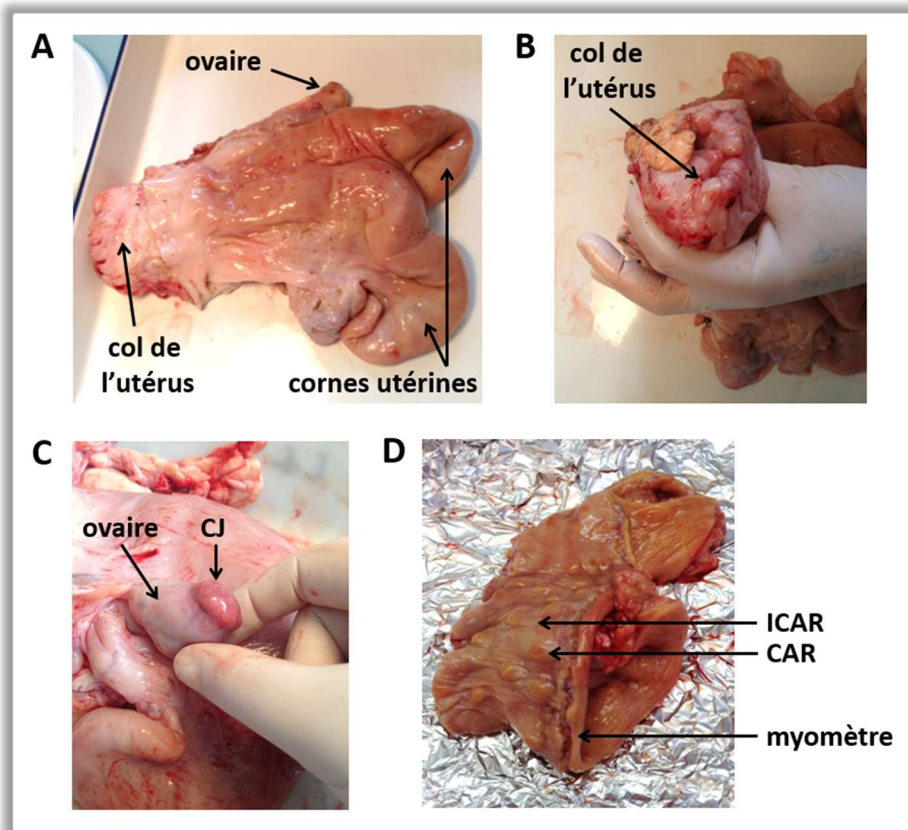


Figure 28 : Les principales étapes du prélèvement de l'endomètre à partir d'utérus entier.

A- Récupération du tractus génital entier en abattoir ; B- Vérification de l'absence de mucus ; Les utérus sont sélectionnés à l'abattoir en fonction de la taille et de la couleur du CJ (Arosh *et al.*, 2002) C- Observation du corps jaune (CJ). ; D- Ouverture longitudinale de la corne utérine puis dissection de l'endomètre (zones CAR et ICAR).

Des prélèvements sanguins dans la veine utérine ont été tentés afin de doser la P4 circulante et confirmer le stade du cycle œstral de l'animal. Les tractus étant disponibles plus d'1h post mortem, la coagulation du sang résiduel rendait le prélèvement impossible. Les utérus ont de plus été sélectionnés par l'absence d'embryons et de mucus laiteux signe d'une éventuelle contamination (Fig 28B). De 4 à 5 tractus sont transportés en sacs individuels à 4°C jusqu'au laboratoire, soit en nombre supérieur à la gestion de mise en culture des cellules utérines pour parer à toutes les surprises observées à la dissection (ie présence d'embryons en début de développement, utérus tuméfié, etc.). Le corps jaune est ensuite disséqué et pesé pour confirmer le stade du cycle œstral (Fig 28C). Les tractus sont immergés dans un bain d'eau de javel à 0.01%, asséchés, débarrassés des tissus vasculaires et conjonctifs du myomètre et placés dans un environnement stérile sous hôte à flux lumineuse pour la dissection et l'ensemble des procédures de culture (Fig 29).

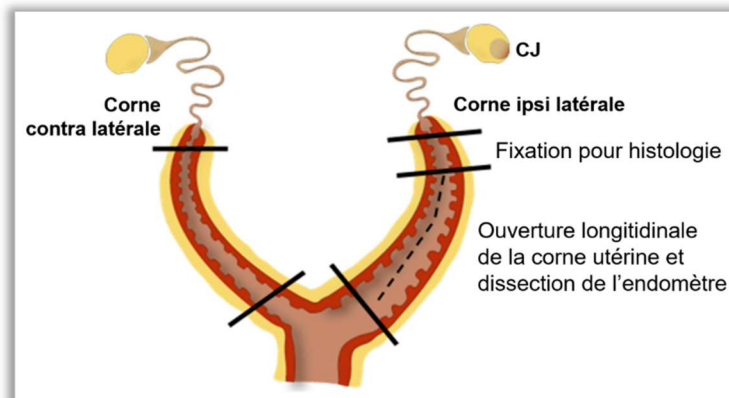


Figure 29 : Dissection de l'utérus pour la culture primaire de cellules endométriales.

Le haut de la corne ipsi latérale au corps jaune (CJ) est prélevé et fixé pour analyse histologique. La corne est ensuite ouverte longitudinalement (pointillés) et l'endomètre est disséqué. (trait noir = section transversale).

Une section transversale du haut de la corne ipsi latérale au corps jaune est prélevée et fixée au PAF 4% (paraformaldéhyde) pour analyse histologique. La corne est ensuite ouverte longitudinalement (Fig 28D), l'endomètre est séparé du myomètre. Des fragments randomisés de zones CAR et ICAR sont prélevés sur la surface de l'endomètre et congelés en azote liquide pour l'analyse ultérieure des transcrits et protéines *in vivo*. Environ 50 cm² de tissu endométrial intact, soit 10 à 15g, est disséqué pour en dériver les cultures primaires de cellules fibroblastes et épithéliales glandulaires (EG). Entre l'abattage de l'animal à distance de centaines de km et la mise en culture des cellules endométriales, il s'écoule environ 16h. Le protocole d'isolement des cellules jusqu'à la

mise en culture décrit ci-après, est long par la quantité de matériel biologique à manipuler et traiter.

Les bovins d'exploitations agricoles ne sont pas des animaux de laboratoire « calibrés », et présentent une forte variabilité inter individuelle multi factorielle. Travailler à partir de déchets d'abattoir permet de disposer d'une grande quantité de matériel biologique à moindre frais, cependant peu d'informations sont accessibles sur l'historique des animaux abattus commercialement, ce qui peut engendrer de la variabilité individuelle mais également être limitant à une étude physiologique rigoureuse.

Nous avons choisi de mettre en place des cultures primaires de cellules endométriales bovines à partir de biopsies utérines. Grâce à l'expertise du personnel de l'Unité Commune d'Expérimentation Animale (UCEA, INRA) il a été possible de réaliser des prélèvements utérins sur animaux vigiles. Il n'est désormais plus nécessaire d'euthanasier les animaux pour prélever l'endomètre. De plus, leur élevage est maîtrisé, les animaux sont traités pour un stade physiologique précis, constituant un modèle expérimental fiable. Des génisses Prim'Hosstein ont été synchronisées selon un protocole maîtrisé par l'équipe de l'unité expérimentale à travers une procédure institutionnelle validée. Les animaux immobilisés sur pied en couloirs de contention avec blocage automatique à l'encolure (Fig 30A) sont anesthésiés localement par voie périurale (Fig 30B). Dans un premier temps la présence d'un corps jaune a été confirmée et localisée (à gauche ou à droite) par palpation transrectale. Les utérus sont lavés avec du PBS (Sigma) à 38°C avant d'être biopsiés, les « flushings » sont récupérés afin d'analyser le fluide utérin dans le cadre de projets développés dans l'unité (Annexe 5a).



Figure 30 : Les principales étapes du prélèvement de l'endomètre par biopsie. A- Maintien des animaux sur pieds en couloir de contention avec blocage à l'encolure ; B- Anesthésie locale par périurale ; C- Maintien et orientation du col de l'utérus par voie transrectale puis réalisation des biopsies utérines.

Pour chaque génisse, 4 à 7 biopsies ont été réalisées dans la partie haute du corps utérin. De 0,45g à 0.70 g de tissu endométrial dédié à la mise en culture ont pu être prélevés par animal. Les biopsies sont récupérées et transportées depuis l'installation expérimentale de Bressonvilliers dans un milieu Euroflush (IMV Technologies) à 4°C. Entre le prélèvement des biopsies et la mise en culture des cellules utérines, il s'écoule en moyenne une dizaine d'heures.

En diminuant considérablement ce délai prélèvement-mise en culture, nous avons pu améliorer le rendement d'isolement des cellules endométriales. En effet lors de la mise en culture, nous estimons la quantité de cellules par mesure de la densité optique (DO) à 490 nm de la solution de cellules en suspension. Nous avons ainsi pu montrer que, rapporté au poids de tissu disponible au départ, la quantité de cellules isolées est plus importante à partir de biopsie qu'à partir d'utérus entier (Fig 31). Cette différence de rendement peut être due au délai prélèvement-mise en culture plus grand en utilisant des utéri et donc une plus grande dégénérescence cadavérique. De plus le protocole d'isolement des cellules à partir d'utéri nécessite des filtres de plus grande surface (pour traiter la grande quantité de tissu) et augmente donc la probabilité de perte de cellules qui resteraient bloquées sur le filtre.

A cette étape du protocole, les cellules EG ne sont pas isolées les unes des autres mais restent en petits « paquets » appelés agrégats de cellules EG. Nous appelons « cellules stromales » les cellules isolées à partir desquelles les fibroblastes sont dérivés (voir protocole ci-dessous).

Rendement d'isolement des cellules (DO/g de tissus)	Utérus	Biopsie
Agrégats de cellules EG	0,16	1,7
Cellules stromales	2,45	9,5

Figure 31 : Rendement d'isolement des cellules endométriales en fonction du mode de prélèvement. Densité optique (DO) à 490 nm de la suspension de cellules par gramme (g) de tissus collectés. (P. Reinaud)

b. Le protocole de mise en culture des cellules endométriales issues de biopsies

Le tissu endométrial réceptionné est traité en conditions stériles en salle de culture sous hotte à flux laminaire. Il est rincé par du PBS (sans Ca/Mg ; Sigma-Aldrich) puis dilacéré finement par découpe manuelle à l'aide de deux scalpels. Le tissu est ensuite incubé dans 10 ml d'une solution de digestion enzymatique [500 unités de Collagénase (Sigma-Aldrich), 250 unités de Hyaluronidase (Sigma-Aldrich) et 1% de Penicilline-Streptomycine (Sigma) par ml de solution d'Euroflush] pendant 1h sous agitation ménagée en bain marie à 37°C. Le tissu digéré est dispersé dans un volume final de 50ml de milieu Euroflush. La séparation des amas de cellules est facilitée mécaniquement par aspirations et refoulements successifs à travers une canule de 1,6 mm de diamètre. Après centrifugation 7 min à 900 rpm, le surnageant est éliminé et le culot dispersé dans le milieu de culture DMEM/F12 de composition et supplémentation décrit ci-dessous. La suspension de cellules est filtrée une première fois sur un tamis cellulaire Cell Stainer de 100 μm (Dutscher) afin d'éliminer le tissu non digéré et les fibres de collagène. La suspension est filtrée une seconde fois sur un tamis cellulaire de 30 μm (PluriStainer-Dutcher). Les agrégats de cellules épithéliales glandulaires retenus sur le filtre sont récupérés dans le milieu de culture DMEM/F12. La quantité des amas glandulaires est estimée par spectrométrie. La densité optique de la suspension cellulaire est mesurée à 490 nm en référence à celle du milieu de culture. Les agrégats sont répartis à raison de 0,25 DO/ml dans des boîtes de culture (TPP) de taille variable en fonction des rendements et cultivés à 38°C et 5% CO₂ en atmosphère humide

Le filtrat, débarrassé des structures épithéliales glandulaires, subit une troisième filtration sur un tamis de 10 μm (PluriStainer-Dutcher) afin d'éliminer les agglomérats cellulaires de tailles supérieures aux cellules fibroblastiques. Ce dernier filtrat est une suspension de multiples cellules stromales, dont la densité est mesurée par spectrométrie à 490 nm comme précédemment. Les cellules stromales sont ensemencées à raison de 2 DO/ml dans des boîtes de culture Primaria (BD) et incubées 2h à 38°C et 20% de CO₂. Cette première incubation en condition hypoxie facilite l'adhérence rapide et préférentielle des fibroblastes. Le rinçage abondant permet l'élimination des cellules flottantes en particulier des cellules sanguines. Les fibroblastes ainsi purifiés sont ensuite cultivés à 38°C sous 5% de CO₂ en atmosphère humide.

Les deux types cellulaires sont cultivés dans un milieu composé de DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagles's Medium : F12 without phenol red ; Sigma-Aldrich), supplémenté avec 10% de Sérum de veau fœtal (SVF ; Biosera), 1 % de glutamine stabilisée (Glutamax, Gibco-Life Technologies), 1% d'Insuline-Transferrine-Sélénium (ITS 1mg-0.55mg-0.5µg ; Gibco-Life Technologies), 1% de Pénicilline-Streptomycine (10mg/ml ; Sigma-Aldrich), 1% de gentamycine (10 mg/ml ; Biosera), 1% d'Amphotéricine B (10mg/ml ; Dutsher) et 0,1% de Nystatine (100000 UI/ml ; Sigma-Aldrich). Le milieu de culture est renouvelé toutes les 24heures jusqu'à l'observation de la confluence des cellules.

c. L'évolution des cultures primaires de cellules endométriales bovines

La croissance des cellules animales au cours de la culture primaire en monocouche peut être décomposée en 4 phases successives (Fig 32). La phase d'adaptation aux conditions de culture qui débute immédiatement après l'ensemencement. Les cellules ne se divisent pas, elles reconstruisent leur cytosquelette et mettent en place les mécanismes d'adhérence avec le support. Les cellules s'étalent sur le fond de la boîte de culture et présentent par observation en microscopie photonique en contraste de phase une morphologie qui leur est caractéristique, cuboïdale pour les cellules épithéliales, fusiforme pour les fibroblastes. Elles entament alors une phase de croissance exponentielle et se divisent avec un temps de doublement qui leur est propre (environ 24h). La croissance des cellules animales ralentit avec la durée de culture qui entrent dans une phase de quiescence puis de sénescences à moins d'avoir été immortalisées et/ou de présenter des caractéristiques de cellules cancéreuses.

Les cellules fibroblastiques endométriales bovines issues de biopsies deviennent quiescentes au bout de 4 semaines de culture. Nous n'avons pas observé de quiescence des fibroblastes issus d'utérus entier ni des cellules épithéliales glandulaires quelle que soit leur origine. Nous supposons que cela est dû au fait que de faibles quantités de cellules fibroblastiques sont obtenues à partir de biopsie. Elles font alors un plus grand nombre de division pour arriver à confluence.

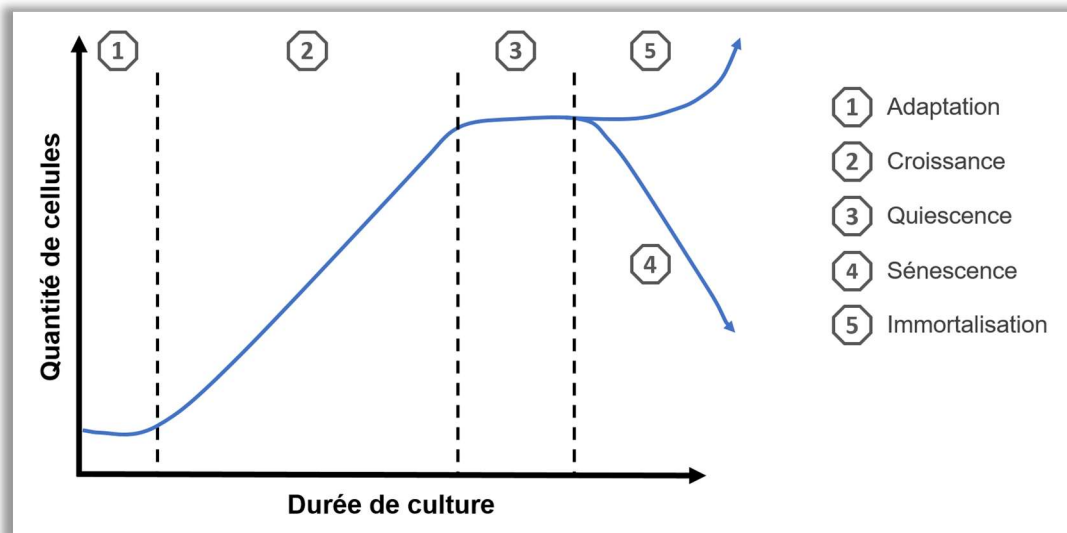


Figure 32 : Evolution schématique de cellules animales en culture.

Les cellules endométriales bovines ont été suivies quotidiennement par observations au microscope inversé en contraste de phase (Fig 33) avec 3 à 5 prises de vues de champs représentatifs. Pendant les deux premières heures de culture en hypoxie, les fibroblastes en nombre relativement faible ne sont identifiables que par leur réfringence sans visualisation possible de leur morphologie. Après 24 heures de culture, les cellules flottantes sphériques et claires réfléchissant la lumière (qui seraient constituées pour partie de cellules sanguines) sont éliminées par rinçages et changements de milieu. La croissance des fibroblastes, dont la morphologie fusiforme est observable au bout de 48h à 72h de culture, permet d'obtenir des tapis de cellules confluentes en 7 à 9 jours de culture.

Après 24h de culture, les agrégats de cellules épithéliales glandulaires commencent à adhérer au support. Les cellules EG se développent à partir des agrégats pour former des îlots de cellules cuboïdes présentant des jonctions serrées qui tapissent la surface de la boîte de culture en 7 à 8 jours de culture. Les cultures primaires épithéliales et fibroblastiques sont cultivées pour atteindre environ 90% de confluence estimée par la surface du support de culture recouverte de cellules. Elles sont maintenues en culture de 7 à 9 jours après l'ensemencement avec un renouvellement de milieu toutes les 48 heures. A ce stade les cellules sont en pleine phase d'expansion. Elles sont alors décollées du support par trypsination douce (TrypLE Express, Gibco) pour partie réensemencées pour une phase d'expansion en passage 1, ou cryogénisées et stockées à -80°C puis en azote liquide.

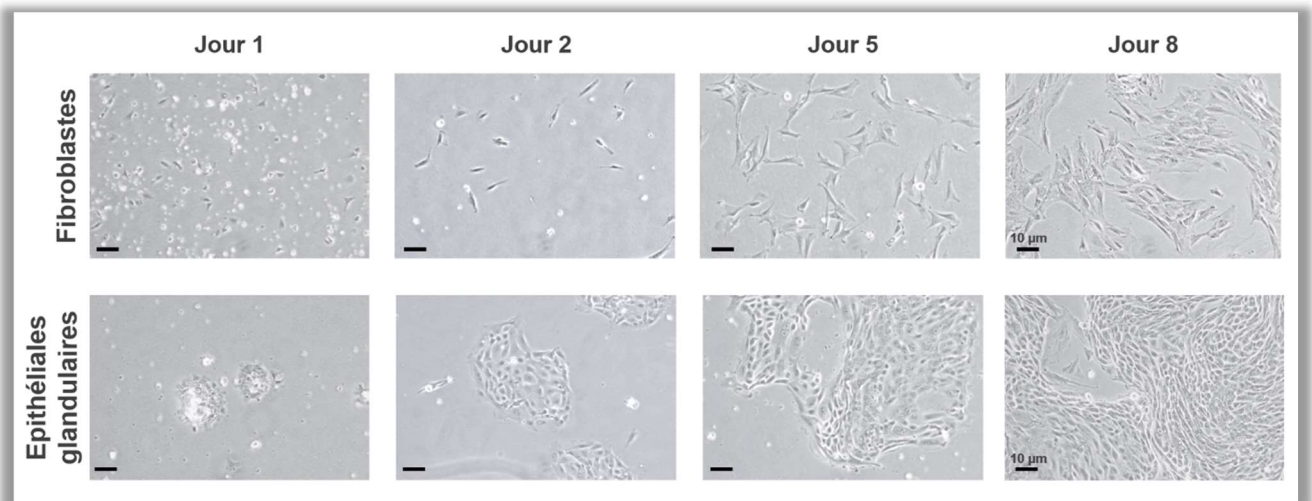


Figure 33 : Suivi des cultures primaires de cellules endométriales bovines – fibroblastes et épithéliales glandulaires – Observations par microscopie en contraste de phase. Photographies réalisées les jours 1, 2, 5 et 8 après renouvellement du milieu de culture.

La nature des cellules endométriales a été confirmée par marquage immuno cytochimique (Fig 34). Les cellules EG expriment exclusivement la Cytokératine 8 alors que les fibroblastes expriment exclusivement la Vimentine. Les noyaux des cellules sont marqués au DAPI (1 : 2000 ; Sigma).

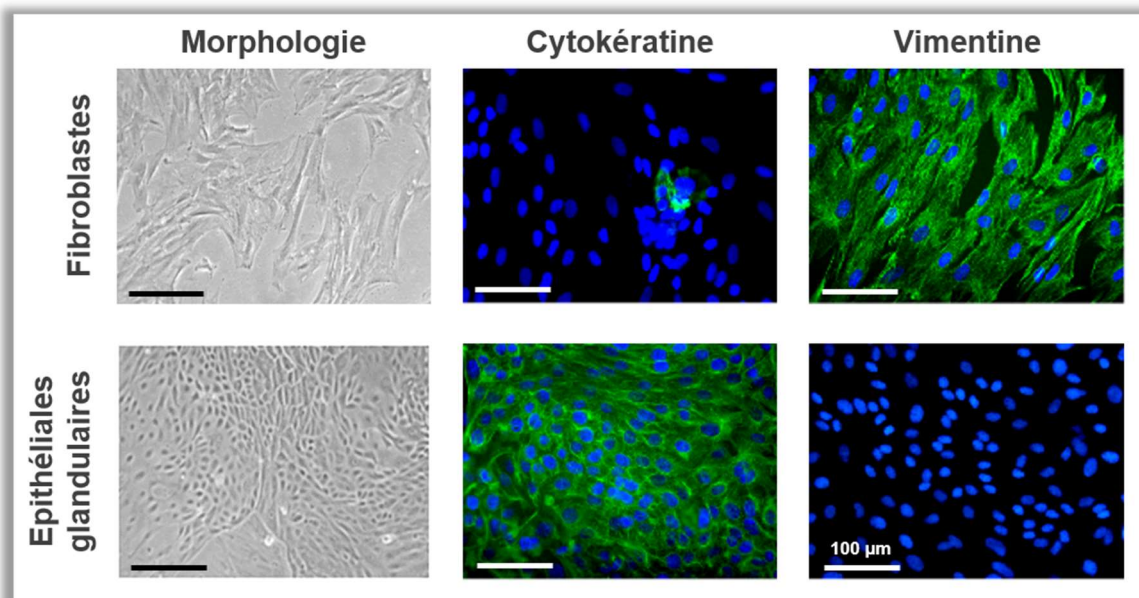


Figure34 : Caractérisation des cellules utérines bovines. La morphologie du tapis de cellules est observée au microscope inversé en contraste de phase. La Cytokératine 8 et la Vimentine sont visualisées par immuno cytochimie (vert). Elles sont respectivement exprimées dans les cellules épithéliales glandulaires et les fibroblastes. Les noyaux sont marqués par le DAPI (bleu). Les images sont prises au microscope inversé à fluorescence (P. Reinaud).

d. Comparaison des cultures primaires de cellules endométriales bovines en fonction du jour de prélèvement du tissu

Les cultures primaires de cellules endométriales bovines ont été mises en place pour développer un modèle *in vitro* permettant d'identifier les gènes cibles de FOXL2. L'expression de FOXL2 dans l'endomètre bovin variant au cours de cycle œstral (Eozenou *et al.*, 2012), nous nous sommes donc demandés si les cellules endométriales bovines conservaient des caractéristiques propres au statut physiologique de l'animal donneur le jour du prélèvement.

Les cultures primaires ont toutes été dérivées à partir de biopsies issues de génisses Holstein synchronisées. Nous avons prélevé les tissus endométriaux au cours de trois phases distinctes du cycle œstral. En phase lutéale précoce (J3, metœstrus) le taux d'E2 est faible et celui de la P4 commence à augmenter. En phase lutéale tardive (J15, diœstrus), l'endomètre est sous influence de la P4 dont la sécrétion est maximale. Et enfin en phase folliculaire (J18, proœstrus) le taux de P4 circulante a chuté et celui d'E2 commence à augmenter (Fig 35).

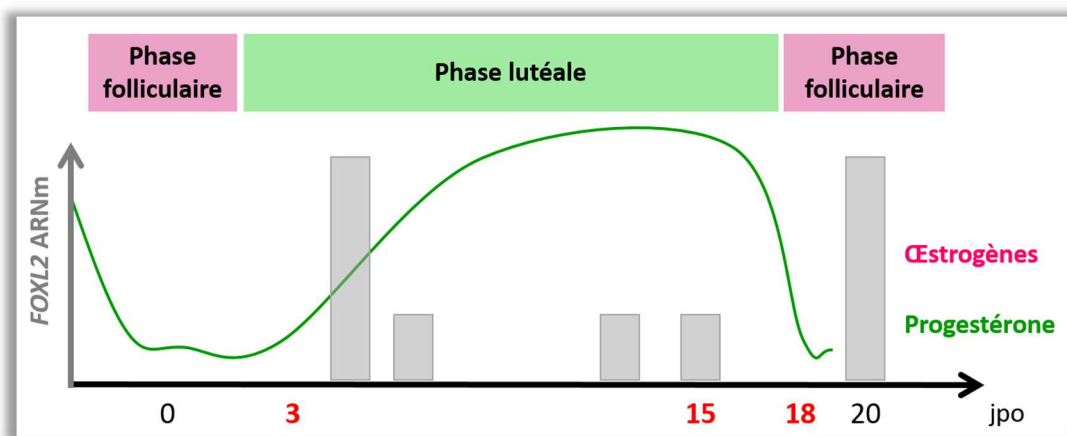


Figure 35 : Prélèvements des tissus endométriaux bovins au cours du cycle œstral.

Le niveau d'expression du transcrite FOXL2 dans les cellules endométriales a été analysé par RT-qPCR (Annexes 1.b et 1.c) en fonction du jour de prélèvement de la biopsie puis la protéine FOXL2 a été localisée par immuno cytochimie (Annexe 1.d) dans les cultures primaires de cellules endométriales bovines (Fig 36).

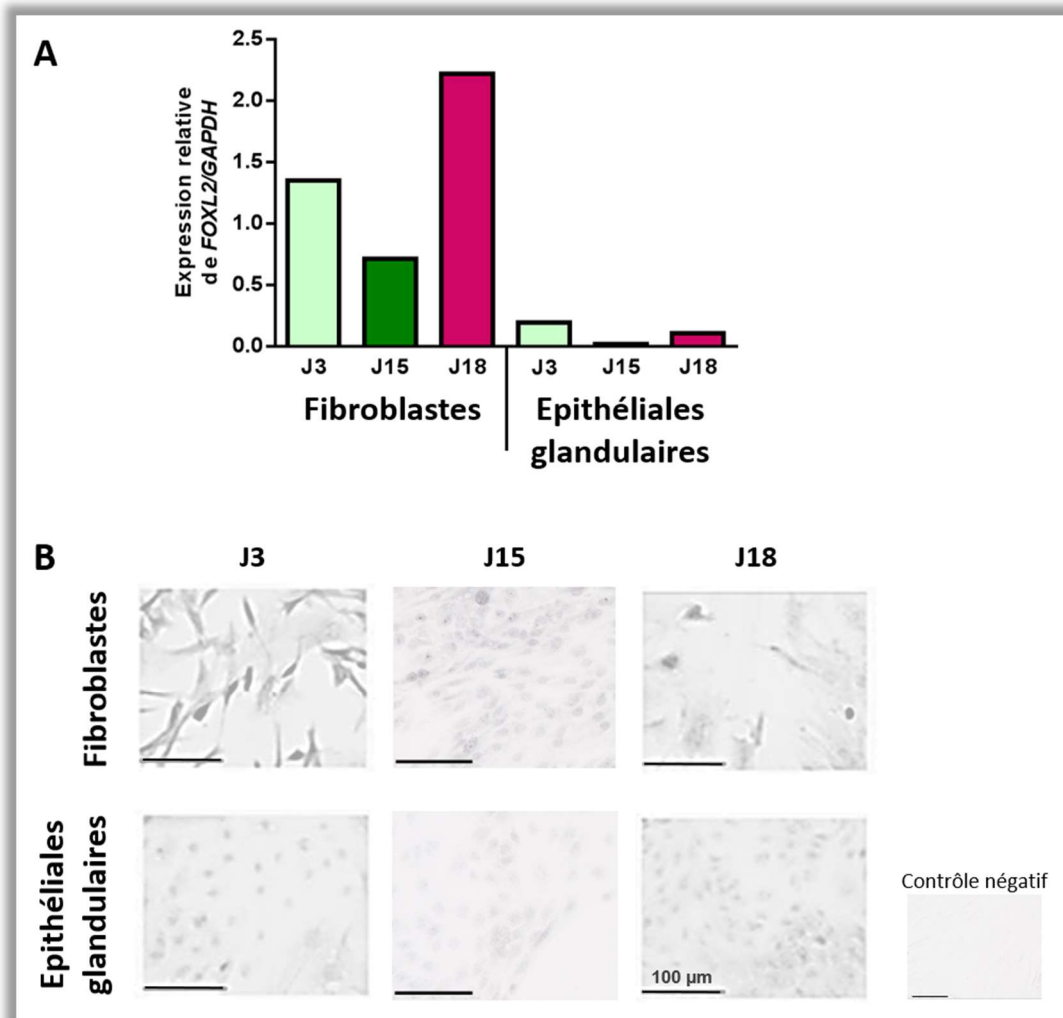


Figure 36 : Variations de *FOXL2* dans les cellules endométriales bovines en fonction du jour de prélèvement de l'endomètre. A- Expression du transcrite *FOXL2* dans les cellules endométriales bovines ; Expression des ARNm évaluée par RT-qPCR et normalisée par rapport à l'expression du gène de ménage *GAPDH* ; B- Expression de la protéine *FOXL2* dans les cellules endométriales bovines, protéines révélées par immunocyto chimie. (M. Delessard, stage master 1, 2014).

Nous avons ainsi montré que l'expression de *FOXL2* est plus élevée dans les fibroblastes que dans les cellules EG et ce quel que soit le jour de prélèvement (Fig 36A). De plus l'expression de *FOXL2* est la plus faible à J15 dans les deux types cellulaires. L'immuno cytochimie met en évidence la présence de la protéine *FOXL2* dans les deux types cellulaires et comme précédemment le taux de *FOXL2* est plus faible dans les cellules EG que dans les fibroblastes. La protéine est localisée dans le noyau des cellules, une localisation cohérente avec le lieu d'action du facteur de transcription. Le marquage est de plus faible intensité à J15 par rapport à J3 et J18.

Les profils d'expression des ARNm et protéines FOXL2 dans les cellules endométriales se suivent avec des niveaux globalement plus élevés dans les fibroblastes que dans les cellules EG. *In vivo* l'expression de *FOXL2* est plus forte dans les caroncules que dans la zone intercaroncules (Eozenou *et al.*, 2012). Les caroncules étant des zones aglandulaires, nos résultats *in vitro* sont cohérents avec les données *vivo*. De plus dans l'endomètre bovin, l'expression de *FOXL2* est négativement corrélée au taux de P4 circulante et donc plus faible en phase lutéale tardive. Les cultures primaires dérivées à partir d'endomètres prélevés en phase lutéale tardive (J15) présentent les taux de transcrits et de protéines FOXL2 les plus faibles.

Cette étude a été réalisée avec Marion Delessard dans le cadre de son stage de master 1. Les gènes *PGR* (récepteur à la P4) et *PTGS2* ont été analysés en parallèle. Ils présentent eux aussi une expression différentielle en fonction du jour de prélèvement et celle-ci est corrélée à leur expression *in vivo* (données non publiées). Les cellules endométriales bovines conservent donc en mémoire certaines caractéristiques propres au statut physiologique de la femelle dont elles sont issues. Pour réaliser la surexpression de *FOXL2*, nous avons donc sélectionné les cultures dérivées à partir de biopsies prélevées au 15^{ème} jpo.

3. Optimisation des conditions de transfection transitoire dans les cultures primaires d'endomètre bovin

Le protocole de transfection transitoire est développé à l'aide d'un plasmide codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein ; GFP max, Lonza ; annexe 1.e) sous contrôle d'un promoteur fort. Le transgène est en effet facile à visualiser au microscope à fluorescence. Par soucis de simplicité et afin de traiter un nombre important d'échantillons en parallèle, j'ai tout d'abord optimisé le protocole de transfection transitoire par lipofection. Le taux de transfection des cellules EG n'étant pas satisfaisant (inférieur à 10%), j'ai comparé les protocoles de transfection transitoire par électroporation et magnétofection (Fig 37). Quatre jours avant la transfection, les fibroblastes et les cellules EG sont décongelés lentement au bain marie à 38°C puis mis en culture sur plaque 12 puits (soit un diamètre de 22 mm, TPP) dans du milieu DMEM/F12 complet à 38°C et 5% de CO₂.

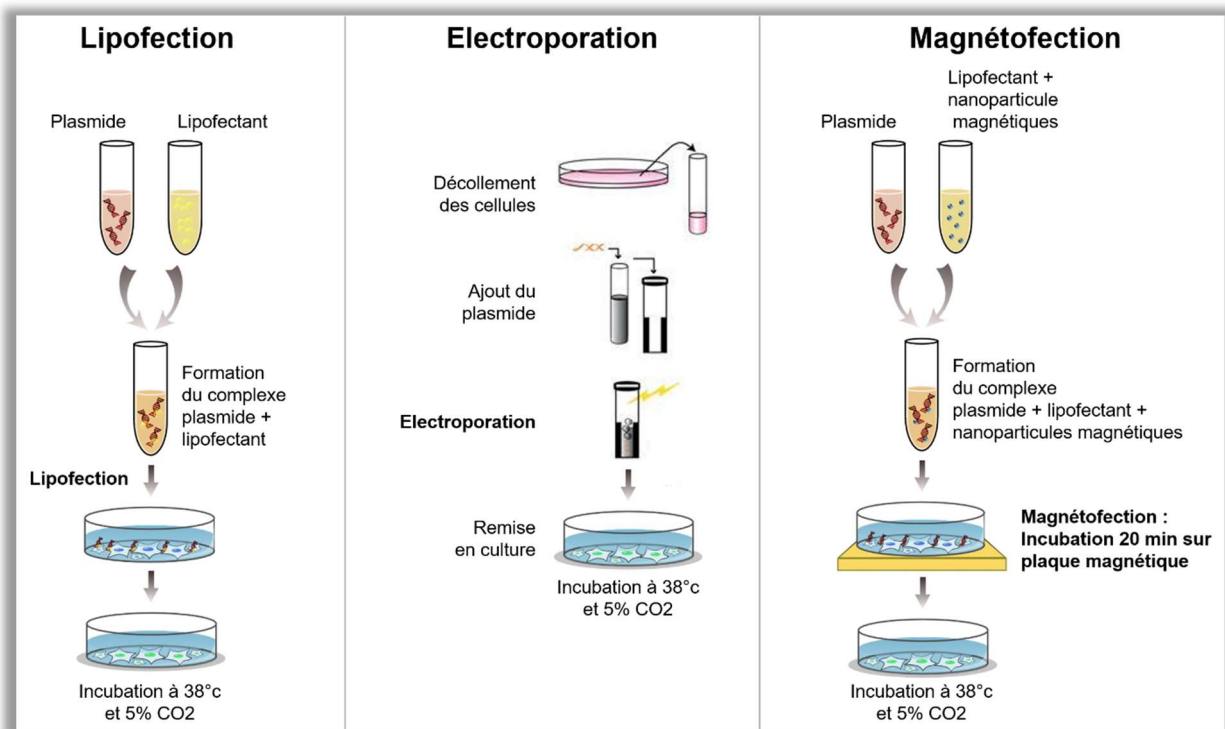


Figure 37 : Protocoles de transfection transitoire des cellules endométriales bovines.

a. Optimisation du protocole de transfection transitoire par lipofection

Transfection transitoire des fibroblastes endométriaux bovins

Les fibroblastes sont transfectés 24h avec 500 ng de plasmide GFP max et 2 μ l de lipofectant (annexe 1.f). Après avoir testé plusieurs lipofectants (Lipofectamine, GeneCellIn, Turbofect), l'Xtreme Gene (Roche) a été choisi car il présente une faible cytotoxicité (publication complémentaire, Eozenou *et al.*) et a été développé pour être particulièrement efficace pour la transfection de fibroblastes humains. Les taux de transfection ont été quantifiés par comptage manuel des cellules marquées au DAPI et GFP positives. Sur fibroblastes bovins le taux de transfection à 24h est de 70 à 80% dans les conditions initiales de 500 ng de plasmide et 2 μ l de transfectant.

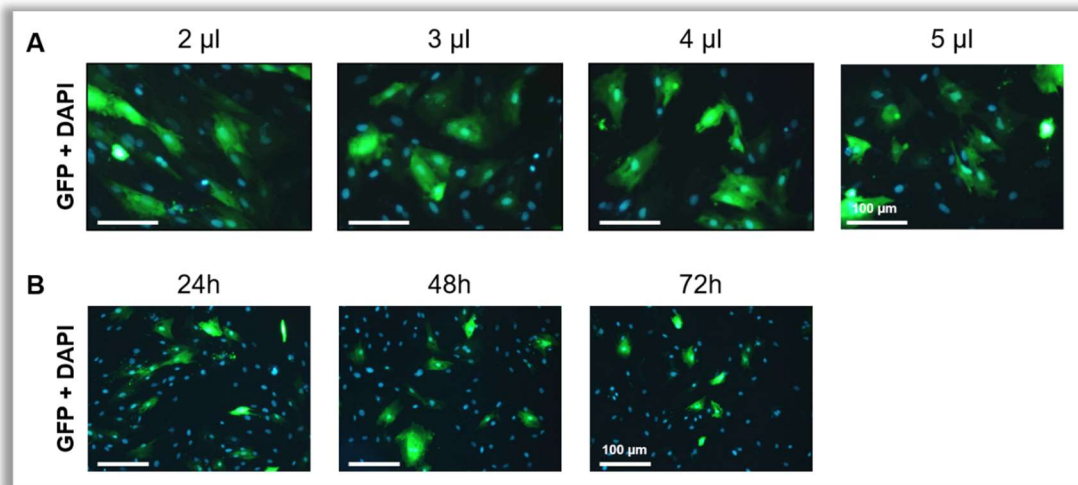


Figure 38 : Observation au microscope inversé à fluorescence des fibroblastes endométriaux bovins transfectés transitoirement par lipofection par un plasmide GFP. A – Augmentation progressive du volume de transfectant (2, 3, 4 et 5 μ l d'Xtreme Gene ; Roche) à quantité de plasmide constante (500 ng de GFPmax) ; B – Augmentation de la durée de transfection de 24 à 48 puis 72h ; Les cellules GFP positives apparaissent en vert ; Les noyaux sont marqués au DAPI (1 :2000 ; bleu).

Le volume de lipofectant est progressivement augmenté à quantité de plasmide constante (Fig 38A) mais cela ne permet pas d'améliorer le taux de transfection des fibroblastes endométriaux bovins. La durée de la transfection transitoire (500 ng de plasmide et 2 μ l d'Xtreme Gene) a été allongée de 24 à 48 puis 72h (Fig 38B) mais nous n'observons pas d'amélioration du taux de transfection non plus. Au contraire plus la transfection est longue plus le taux de transfection semble diminuer. Il y a très peu de cellules flottantes donc la mortalité cellulaire est faible sur les 24 à 72h d'incubation. Il semble plutôt que les cellules transfectées se divisent plus lentement que les autres,

probablement à cause de la présence du plasmide. Les cellules GFP positives se retrouvent donc visuellement en plus faible proportion.

Transfection transitoire des cellules épithéliales glandulaires endométriales bovines

Les cellules EG sont transfectées 24h avec 500 ng de plasmide GFP max et 2 à 5 μ l de lipofectant Xtreme Gene (Fig 39A). Le taux de transfection est extrêmement faible (< 5%). Les cellules GFP positives se trouvent principalement à la périphérie des îlots de cellules EG, là où les cellules sont en croissance. Le transfectant et le plasmide sont mis en présence des cellules EG en suspension dans le but d'augmenter l'efficacité de transfection et de mieux répartir le plasmide (Fig 39B).

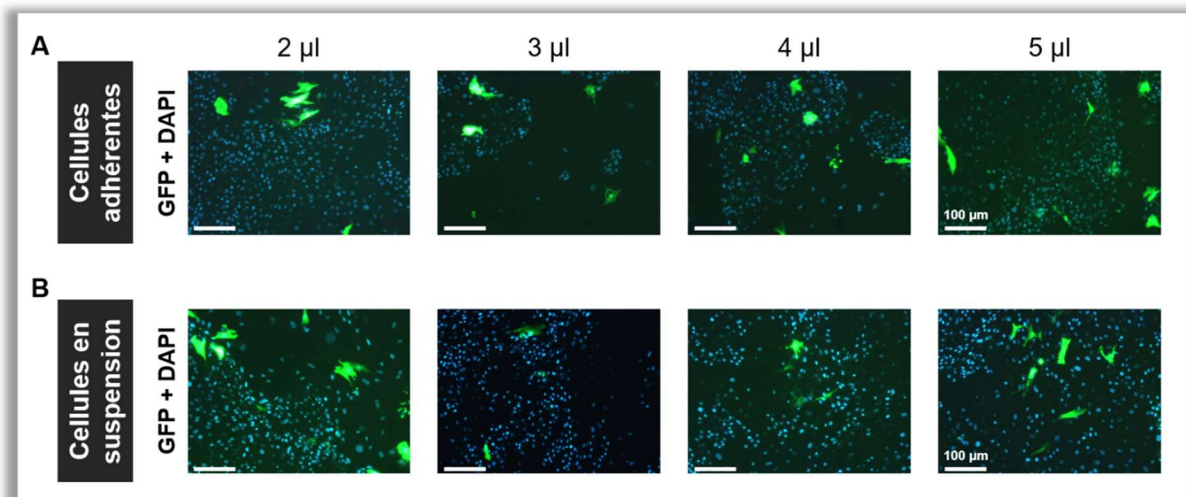


Figure 39 : Observation au microscope inversé à fluorescence des cellules épithéliales glandulaires endométriales bovines transfectées transitoirement par lipofection. Les cellules épithéliales glandulaires adhérentes ou en suspension sont transfectées 24h. Les cellules GFP positives apparaissent en vert ; Les noyaux sont marqués en bleu par le DAPI.

Des cellules GFP positives sont présentes au cœur des îlots mais le taux de transfection des cellules EG est toujours inférieur à 5%. La transfection transitoire par lipofection des cultures primaires de cellules endométriales bovines n'est donc pas envisageable.

b. Transfection transitoire des cellules endométriales bovines par magnétofection

Plusieurs lipofectants différents ont été testés dans l'équipe d'accueil avant mon arrivée mais aucun n'était assez performant pour la transfection transitoire des cellules EG. Mes prédécesseurs ont également testé la transfection à l'aide de rétrovirus sans

succès. Nous avons alors testé la magnétofection et comparé son efficacité à celle de l'électroporation.

La transfection par électroporation est réalisée selon le protocole de Lonza Amaxa™ (annexe 1.g). Différents programmes de transfection ont été testés pour l'électroporation des fibroblastes et des cellules EG. Les programmes ont été choisis selon les recommandations du fournisseur. Ils ont été sélectionnés pour chaque type cellulaire en utilisant comme critère les taux de survie cellulaire et de transfection. Les programmes sont prédéfinis dans l'électroporateur donc la durée et l'intensité du courant généré ne sont pas maîtrisés. Nous utilisons les programmes U023 pour les fibroblastes, T013 et Y001 pour les cellules EG. Les taux de transfection sont d'environ 80 à 90% pour les fibroblastes et 20 à 30% pour les cellules EG (Fig 40A). L'électroporation affecte fortement la morphologie des cellules qui sont globalement plus petites. Il y a également une forte mortalité cellulaire.

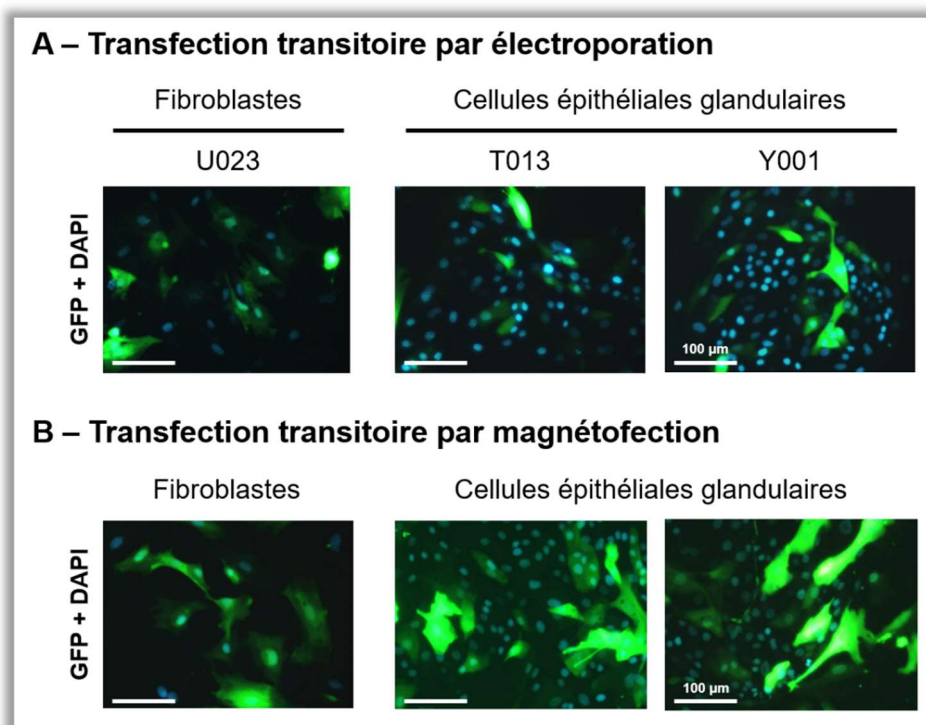


Figure 40 : Observations au microscope inversé à fluorescence des cellules endométriales bovines transfectées transitoirement. A- Transfection transitoire par électroporation avec le système Amaxa (Lonza) ; B- Transfection transitoire par magnétofection avec le CombiMag (Ozbiosciences) ; vert : GFP, bleu : DAPI.

La magnétofection™ est une méthode simple développée spécifiquement pour la transfection des cultures primaires et des cellules difficiles à transfecter (OzBioscience, annexe 1.h). Comme pour la lipofection, la magnétofection débute par le couplage du

plasmide avec le lipofectant puis l'ensemble est couplé à des nanoparticules magnétiques. Le transfectant est réparti dans le milieu de culture. Les cellules sont incubées sur la plaque magnétique, le complexe est alors concentré et transporté dans les cellules par un champ magnétique faible. La force magnétique favorise l'absorption du plasmide par les cellules. Nous observons 90 à 95% de transfection pour les fibroblastes (Fig 40B). L'amélioration la plus importante est pour les cellules EG pour lesquelles le taux de transfection est de 40 à 50%. En outre, en alliant la transfection biochimique par lipofection à la force magnétique, la mortalité cellulaire est quasi nulle. Contrairement aux cellules transfectées par électroporation, les cellules endométriales transfectées par magnétofection conservent une morphologie semblable à celle des cellules non transfectées : les fibroblastes sont plus gros et présentent des lamellipodes, signes de la présence d'un cytosquelette fonctionnel et d'une communication entre les cellules ; les cellules EG quant à elles continuent leur croissance et sont quasiment confluentes 24h après la transfection.

La magnétofection est donc la technique de transfection transitoire testée la plus efficace pour la surexpression de *FOXL2* dans les cultures primaires des cellules endométriales bovines.

c. Validation de la surexpression de *FOXL2* dans les cultures primaires de cellules endométriales bovines

Le plasmide pSG5 (Agilent ; annexe 1.i) est utilisé comme contrôle négatif de transfection lors de la surexpression de *FOXL2* dans les cellules endométriales bovines. Le gène caprin codant pour *FOXL2* a été intégré dans le plasmide vide pSG5 (annexe 1.j ; plasmides fournis par M. Pannetier, BDR, INRA).

La protéine FOXL2 est détectée dans les cellules endométriales bovines par immunocytochimie (Fig 41A). FOXL2 est présent en très faible quantité dans les cellules transfectées avec le plasmide vide pSG5. Dans les fibroblastes le signal est homogène dans l'ensemble des cellules mais dans les cellules EG il est plutôt nucléaire. Les fibroblastes transfectés avec le plasmide pSG5-*FOXL2* présentent un fort taux de protéine FOXL2 (environ 95%). La protéine est essentiellement nucléaire mais elle est détectée également dans le cytoplasme. Le niveau de protéine FOXL2 dans les cellules EG est plus élevé dans

les cellules transfectées avec le plasmide pSG5-*FOXL2* que dans les contrôles. La protéine est localisée dans le noyau. Le taux de transfection des cellules EG est d'environ 40% et l'intensité du signal n'est pas homogène d'une cellule à l'autre. Afin de confirmer que la surexpression de *FOXL2* dans les cellules EG, la protéine a été détectée par western blot (Fig 41B). Le taux de *FOXL2* dans les cellules EG est bien augmenté dans les cellules transfectées avec le plasmide pSG5-*FOXL2* par rapport aux contrôles transfectés avec le plasmide vide pSG5.

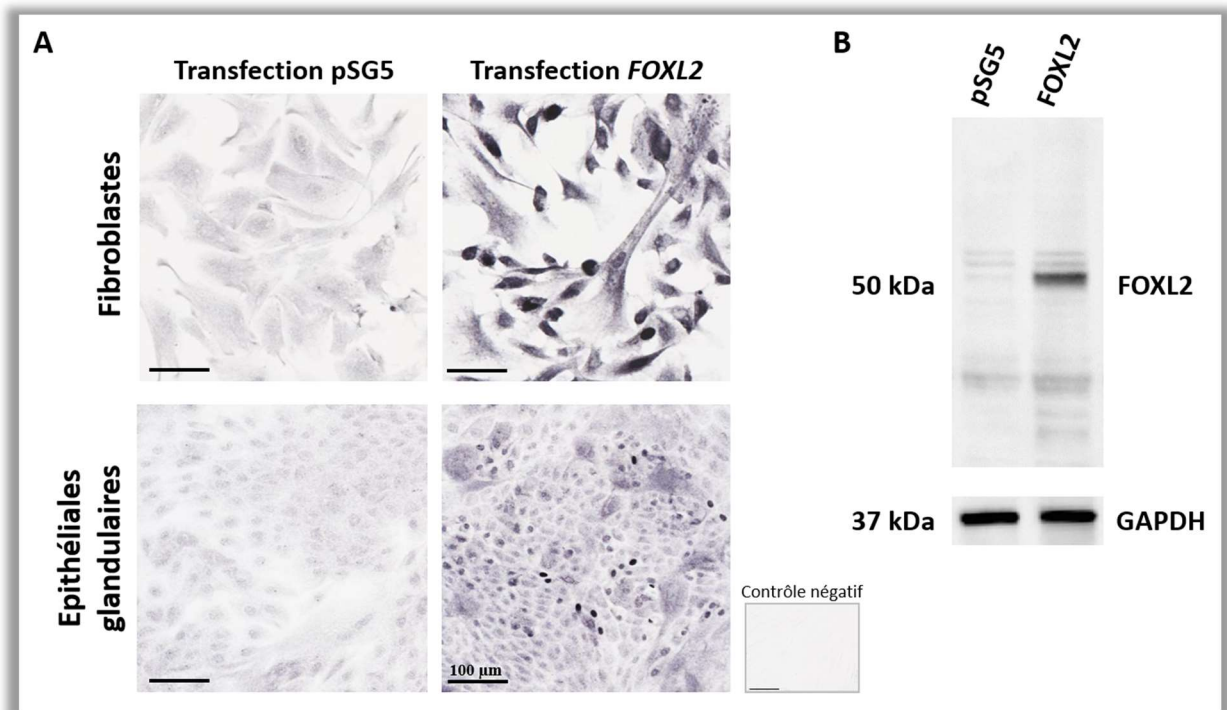


Figure 41 : Surexpression de *FOXL2* dans les cultures primaires de cellules endométriales bovines.

A- Localisation subcellulaire de *FOXL2* dans les fibroblastes et les cellules épithéliales glandulaires par immuno cytochimie. Les cellules transfectées pSG5 sont les contrôles négatifs de transfection ;
 B- Détection de la protéine *FOXL2* (50 kDa) dans les cellules épithéliales glandulaires par western blot. La détection de la *GAPDH* (37 kDa) est le contrôle positif.

Le protocole de transfection transitoire par magnétofection permet donc d'augmenter efficacement la quantité de protéine *FOXL2* produite par les cultures primaires de cellules endométriales bovines. La transfection est plus efficace dans les fibroblastes que dans les cellules EG néanmoins *FOXL2* est accumulé dans le noyau. Cette localisation subcellulaire est nécessaire pour l'activité biologique du facteur de transcription.

Quel que soit le protocole utilisé, la transfection a un effet sur l'expression des gènes des cellules indépendamment du plasmide transfecté. L'expression de deux gènes cibles

putatifs de FOXL2 a été quantifiée par RT-qPCR (Annexe 1.c ; Fig 42). Les gènes *ATF3* et *TNFAIP3* sont impliqués dans la réponse de la cellule au stress et donc fortement susceptibles d'être impactés par la transfection. L'effet de la transfection est mis en évidence par comparaison des quantités d'ARNm représentées ici sous forme de ratio. L'électroporation stimule l'expression de ces deux gènes dans les fibroblastes (*ATF3* et *TNFAIP3* : 1,6 fois) et les cellules EG (*ATF3* : 2,0 fois et *TNFAIP3* : 2,2 fois ; Fig 42A). L'effet de la magnétofection sur l'expression d'*ATF3* (1,5 fois dans les fibroblastes et 2,0 fois dans les cellules EG ; Fig 42B) est sensiblement le même que l'électroporation. Cependant l'expression de *TNFAIP3* n'est quasiment pas impactée par la magnétofection (0,85 fois dans les cellules EG). Ces résultats confirment les observations morphologiques faites précédemment et montrent que la magnétofection est la technique de transfection qui perturbe le moins les cellules endométriales bovines.

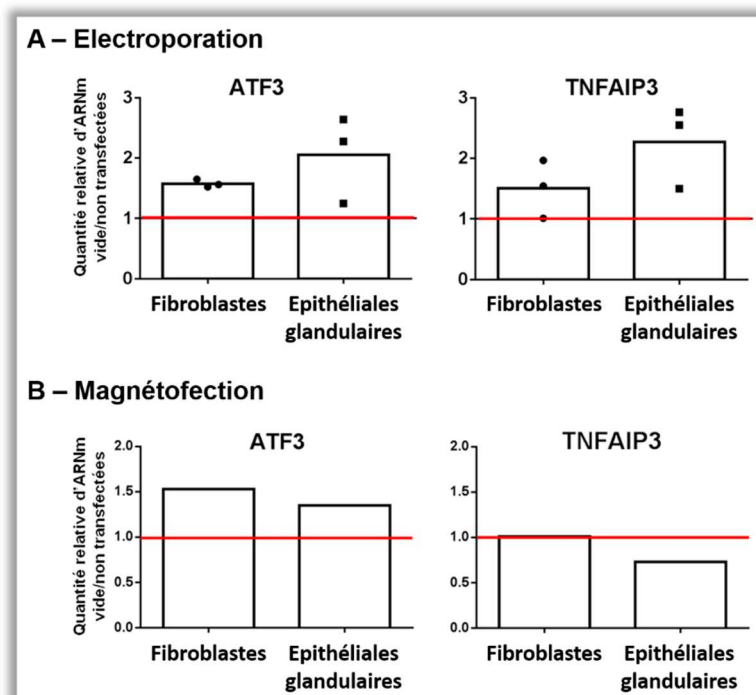


Figure 42 : Effet de la transfection transitoire sur l'expression d'*ATF3* et de *TNFAIP3*, des gènes cibles putatifs de FOXL2. A- Effet de l'électroporation ; B- Effet de la magnétofection ; Les taux des transcrits sont représentés sous forme de ratio du niveau d'expression dans les cellules transfectées avec le plasmide vide pSG5 par rapport aux cellules non transfectées ($P < 0,05$).

Afin de vérifier que la protéine FOXL2 est biologiquement active dans les cellules transfectées pSG5-FOXL2, l'expression de gènes cibles putatifs a été analysée (Fig 43) par RT-qPCR. Les expressions d'*ATF3*, *RGS2*, *RSAD2* et *TNFAIP3* sont normalisées par rapport à l'expression du gène de ménage *RPL19*. Les données ont été analysées avec R par Kruskal-Wallis avec le plug-in Coin (Conditional Inference procedures in a Permutation-Test Framework ; Package Rcmdr). Dans les fibroblastes, la surexpression de *FOXL2* stimule l'expression d'*ATF3* (1,88 fois ; $P < 0,001$) et de *RSAD2* (5,05 fois ; $P < 0,001$). Dans les cellules EG, *FOXL2* stimule l'expression d'*ATF3* (1,67 fois ; $P < 0,05$), de *RGS2* (1,84 fois ; $P < 0,05$) et de *RSAD2* (4,25 fois ; $P < 0,001$). En revanche, *TNFAIP3* n'est pas un gène cible de FOXL2 dans notre modèle. Les taux de transcrits des gènes cibles varient en fonction de l'animal prélevé mais le taux d'induction par FOXL2 est sensiblement le même dans les trois cultures. Il y a une plus grande variabilité de réponse pour le gène *RSAD2* mais elle n'est pas animal dépendante.

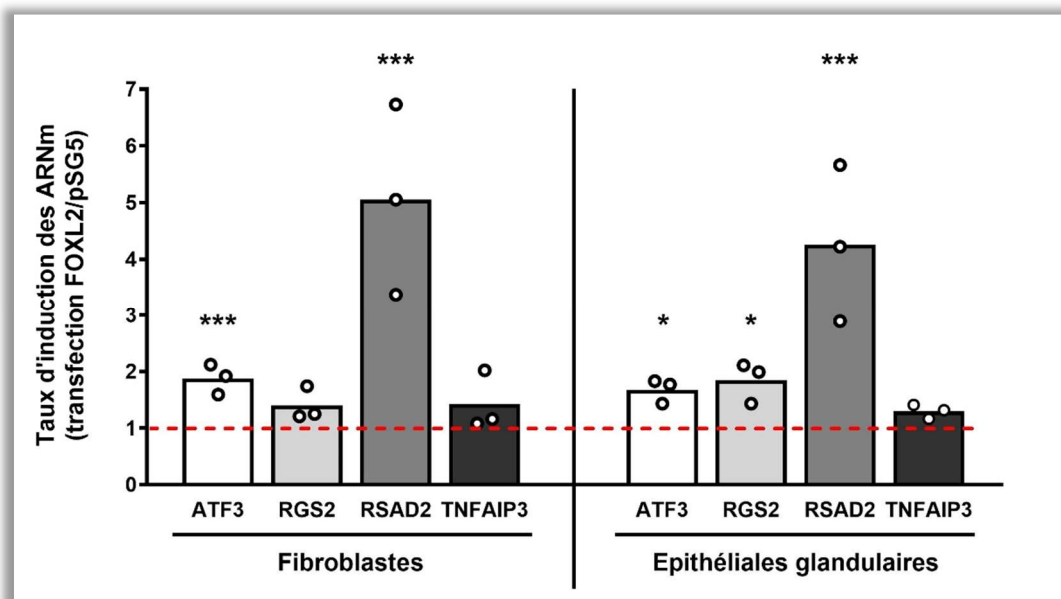


Figure 43 : Expression des gènes cibles putatifs de FOXL2 dans les fibroblastes et les cellules épithéliales glandulaires. Les taux des transcrits sont représentés sous forme de ratio du niveau d'expression dans les cellules transfectées avec le plasmide pSG5-FOXL2 par rapport aux cellules transfectées avec le plasmide vide pSG5. Lorsque le taux est supérieur à 1 (pointillés rouges) cela signifie que FOXL2 stimule l'expression du gène cible. Les cercles blancs représentent les cultures issues de trois génisses différentes. L'expression des gènes cibles putatifs est normalisée par rapport à l'expression du gène de ménage *RPL19*. (* : $P < 0.05$; *** : $P < 0.001$).

La protéine FOXL2 surexprimée par transfection transitoire est donc biologiquement active et est capable de réguler l'expression de gènes cibles dans notre modèle.

4. Discussion

Nous sommes parvenus à développer un modèle *in vitro* de cultures primaires de cellules endométriales bovines dérivées de biopsies utérines et à mettre au point un nouveau protocole de transfection transitoire. Le taux de transfection des fibroblastes est d'environ 90% et celui des cellules EG est inférieur à 50%. L'efficacité de transfection est donc augmentée avec le protocole de magnétofection notamment pour les cellules EG particulièrement difficiles à transférer.

L'expression d'*ATF3*, *RGS2* et *RSAD2* est affectée par la surexpression de *FOXL2*, leur fonction biologique sera discutée dans la partie 3. La stimulation des gènes cibles étudiés ici est relativement faible (< 2 fois pour les gènes *ATF3* et *RGS2* : 5,05 fois pour *RSAD2*). Dans les cellules KGN, l'expression des gènes cibles est stimulée d'un facteur 6 maximum par *FOXL2* (Batista *et al.*, 2007; Benayoun *et al.*, 2008). Bien que les taux d'induction soient faibles, nos résultats sont donc cohérents avec les données de la littérature.

Nos résultats, bien que préliminaires, montrent que la réponse à *FOXL2* est dépendante du type cellulaire considéré. L'analyse séparée des fibroblastes et des cellules EG est donc nécessaire afin de déterminer le rôle de chacun dans la physiologie endométriale bovine. Dans les études *in vivo* actuellement publiées, les zones CAR et ICAR sont analysées séparément mais les tissus prélevés contiennent plusieurs types cellulaires (fibroblastes, cellules EG, épithéliales luminales, endothéliales, immunitaires, etc.). Il est difficile d'estimer la proportion de chaque type cellulaire dans les tissus, source de variabilité dans les échantillons indépendamment de la variation de l'expression des gènes due au protocole expérimental. L'utilisation de la microdissection laser permettrait d'isoler les cellules d'intérêt à partir de coupes de tissu congelé et d'analyser séparément l'expression des gènes dans les fibroblastes et dans les cellules EG d'un même échantillon. Il est alors possible de s'affranchir de l'hétérogénéité cellulaire de l'endomètre dans les études *in vivo*.

Enfin, grâce à l'expertise des animaliers de l'Unité Commune d'Expérimentation Animale de l'INRA, nous avons pu mettre en place des cultures primaires de cellules endométriales bovines dérivées à partir de biopsies utérines. Outre la faisabilité du prélèvement d'endomètre par biopsie sur animal vigile, cette étude montre que la quantité de cellules dérivées à partir de biopsies est suffisante pour mettre en place un modèle d'étude fonctionnelle. Les cultures primaires sont utilisées ici pour l'identification des gènes cibles de FOXL2 par transfection transitoire. L'analyse des transcrits a pu être réalisées à la fois par RT-qPCR et par microarray. En s'affranchissant des prélèvements d'endomètres à partir d'utéri issus d'abattoir, le protocole expérimental a été simplifié et raffiné. En effet, désormais les animaux utilisés sont sélectionnées au sein du troupeau de la ferme expérimentale de l'INRA. Nous pouvons donc en maîtriser l'élevage et synchroniser les génisses afin de prélever les tissus le jour du cycle voulu.

Nous avons montré que les cultures primaires conservent une partie des caractéristiques du statut physiologique de l'animal au moment du prélèvement. Cette propriété des cellules endométriales bovines a permis à l'équipe de mettre en place de nouvelles études. Notamment l'unité d'accueil possède un troupeau de vaches et de génisses clonées à partir d'une seule et même femelle donneuse. Olivier Sandra et ses collaborateurs ont alors développé un modèle d'étude du vieillissement utérin (Annexe 5b) par comparaison de l'endomètre d'un groupe de jeunes et de vieux clones (respectivement en moyenne 4,6 et 13,1 ans). L'obtention de la naissance de veaux clonés est particulièrement difficile et donc l'abattage de ces animaux pour l'étude du tissu endométrial n'est pas envisageable. Le prélèvement du tissu endométrial a été effectué par biopsies. Une partie d'entre elles a été analysée par microarray. Les autres ont permis de dériver des cultures primaires de fibroblastes et cellules EG. L'analyse fonctionnelle des cellules endométriales a mis en évidence une variation de la réponse à l'IFNT *in vitro* entre les jeunes et vieux clones.

Le modèle *in vitro* de cultures primaires de cellules endométriales bovines développé au cours de ma thèse, est donc adaptable à de nombreux protocoles expérimentaux en fonction de la fonction biologique posée.

PARTIE 2 :

Effet du métabolisme
maternel sur l'expression
des gènes endométriaux

1. Introduction

Depuis plusieurs décennies les vaches laitières subissent une forte sélection génétique afin d'améliorer la production de lait par animal. Cette augmentation du potentiel laitier est associée à une baisse de la fertilité chez les vaches en lactation aussi bien aux Etats-Unis qu'en Europe (Butler, 1998; Darwash *et al.*, 1999; Zeron *et al.*, 2001 ; Fig 3).

Les besoins nutritionnels de la femelle augmentent drastiquement avec la lactation entraînant un bilan énergétique négatif (NEB) qui peut s'étendre jusqu'à 10-12 semaines après la parturition. L'analyse des métabolites circulants en période post partum chez les vaches en lactation (LACT) et les vaches tarées (DRY) a montré que la production de lait entraîne une diminution de la concentration plasmatique de l'insuline, d'IGF1 et du glucose, mais aussi une augmentation de la concentration plasmatique en acides gras non estérifiés (NEFA) et en β hydroxybutyrate (BHB). Lorsque les femelles sont tarées, les taux de ces métabolites tendent à rejoindre ceux des génisses dès 7 jours après le vêlage (Forde *et al.*, 2015, Fig 44). Les concentrations plasmatiques en NEFA et en BHB reflètent la mobilisation du tissu adipeux pour la production de lait et sont toutes deux associés à une diminution de la fertilité (Garnsworthy *et al.*, 2008). De plus, le statut métabolique des femelles engendre une variation des concentrations en acides aminés et en acides gras dans le liquide folliculaire (Forde *et al.*, 2015).

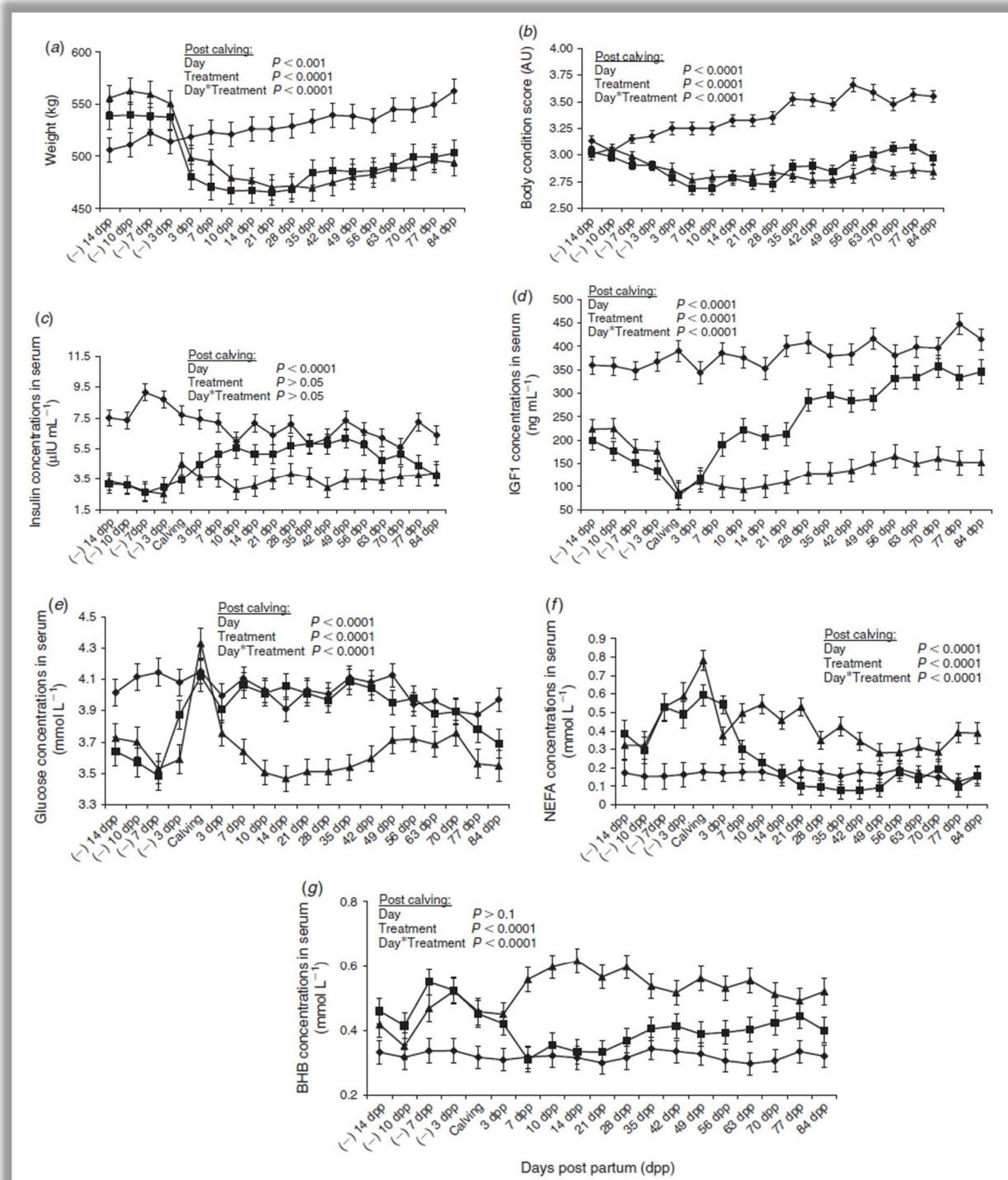


Figure 44 : Suivi hebdomadaire des vaches en lactation (triangle), des vaches tarées (carré) et des génisses (losange). Moyennes \pm sem des mesures (a) du poids en kg ; (b) de la note d'état corporel (BCS) et des concentrations plasmatiques (c) de l'insuline ($\mu\text{IU.mL}^{-1}$), (d) de l'IGF1 (ng.mL^{-1}), (e) du glucose (mmol.L^{-1}), (f) des NEFA (mmol.L^{-1}) et (g) du BHB (mmol.L^{-1}). Les échantillons des vaches ont été prélevés deux fois par semaines pendant les deux semaines avant et après le vêlage puis une fois par semaine. Les échantillons des génisses ont été prélevés deux fois par semaine les quatre premières semaines puis une fois par semaines. (dpp = jours post partum ; Forde et al, 2015)

Le NEB provoque une suppression de la sécrétion pulsatile de LH, une diminution de la production d'E2 par le follicule dominant et donc une perturbation de l'ovulation (Butler, 2003a). L'analyse des embryons produits *in vitro* à partir d'ovocytes issues de femelles en lactation a révélé que les vaches à haut potentiel génétique pour la production de lait présentaient des taux développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste plus faibles que les vaches à potentiel génétique modéré (Snijders *et al.*, 2000). De plus *in vivo*, les vaches DRY produisent des embryons de meilleure qualité que les vaches LACT (Sartori *et al.*, 2002). On estime que seulement 50% des embryons survivent au-delà de 6-7 jpo chez les vaches LACT (Cerri *et al.*, 2009). Lors d'un transfert embryonnaire, l'effet du métabolisme sur la qualité de l'ovocyte est contourné, on observe alors une augmentation significative du taux de gestation chez les vaches LACT transférées par rapport à celles ayant subi une IA (Vasconcelos *et al.*, 2006; Demetrio *et al.*, 2007). Le statut métabolique de la mère joue donc un rôle essentiel dans la production d'ovocytes puis d'embryons de qualité. Plus récemment il a également été montré que la lactation pouvait affecter la programmation ante natale et avoir des conséquences à l'âge adulte (Gonzalez-Recio *et al.*, 2012). En effet les femelles conçues chez les vaches DRY produisent en moyenne 52 kg de lait supplémentaires au cours de la première lactation et ont une espérance de vie plus longue de 16 jours.

Au-delà de la qualité de l'ovocyte et de l'embryon, la réussite de la gestation nécessite un environnement favorable à l'implantation. L'endomètre est le tissu à l'interface avec le conceptus. L'expression des gènes endométriaux peut être altérée par de nombreux facteurs tels que la concentration de P4 circulante (Forde *et al.*, 2009), la lactation (Cerri *et al.*, 2012; Wathes, 2012) ou encore les pathologies utérines (Sheldon *et al.*, 2006; Wathes *et al.*, 2009). L'endomètre est un capteur (*sensor*) biologique de la qualité embryonnaire (Mansouri-Attia *et al.*, 2009a) et est influencé par le statut physiologique de la femelle. Dans cette étude nous nous sommes intéressés aux conséquences des variations du métabolisme maternel sur l'expression endométriale de *FOXL2* et d'une sélection de gènes candidats sélectionnés sur la base de la littérature. Leur expression est régulée dans l'endomètre par la présence du conceptus (Mansouri-Attia *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2014 ; *STAT1*, *PLET1*, *RSAD2*, *SOCS 1,3* et *6*) ; la sécrétion de P4 (Charpigny *et al.*, 1997; Eozenou *et al.*, 2012 ; *FOXL2*, *SCARA5* et *PTGS2*) ou encore le stress oxydatif (Al-Gubory *et al.*, 2008 ; *CAT*, *SOD1* et *SOD2*).

2. Modèle expérimental

Afin de comprendre l'effet de la lactation sur l'expression des gènes endométriaux à l'implantation, un modèle *in vivo* de métabolisme contrasté a été développé en collaboration avec Niamh Forde et Pat Lonergan de l'université de Dublin (Irlande).

Tout d'abord des embryons ont été produits *in vivo* dans des génisses synchronisées (Fig 45A). Dix jours après la détection de l'œstrus, les génisses donneuses ont reçu une injection intramusculaire de Folltropin® (Bionich Animal Health), une FSH porcine purifiée, toute les 12h en dose décroissante (2,5 mL, 2 mL, 1 mL puis 0,5 mL) pendant 4 jours. Lors de la 6^{ème} injection, de la PGF2 α est couplée à la Folltropin®. Une fois le retour à l'œstrus, les génisses ont été inséminées 2 fois à 12h d'intervalle (matin et après-midi). Les embryons sont collectés sept jours plus tard par flush (ou lavage) utérin afin d'être transférés aux femelles receveuses.

En parallèle, des vaches Holstein primipares ont été sélectionnées pour leur indice d'élevage homogène. La moitié d'entre elles ont été tarées juste après vêlage (DRY, jamais traites). Les autres laissées en lactation et traites deux fois par jour (LACT, Fig 45B). Après un délai de 65 à 75 jours post partum nécessaire à l'involution de l'utérus, les femelles LACT et DRY ont reçu une injection de Receptal® (un analogue au GnRH) et un implant vaginal CIDR® libérant de la P4. Sept jours plus tard, elles reçoivent une injection intramusculaire de PGF2 α . Le CIDR® est retiré le lendemain puis 36h après elles ont été à nouveau injectées avec du Receptal® pour mimer l'œstrus. Enfin à 7 jpo, un embryon unique, produit *in vivo*, est transféré dans chaque femelle receveuse. Des génisses Holstein (HEIF) utilisées comme animaux « contrôle » sont synchronisées avec le même protocole puis le jour de l'œstrus elles sont inséminées 2 fois à 12h d'intervalle (matin et après-midi). La qualité embryonnaire est ainsi fixée entre les vaches receveuses et les génisses. A 19 jpo, l'ensemble des animaux est abattu, les concepti sont récoltés pour valider qu'il y a bien eu gestation et vérifier leur stade de développement. On observe 45% de gestation chez les vaches LACT, 80% chez les DRY et 66% chez les HEIF. Les endomètres sont quant à eux disséqués, les zones CAR et ICAR sont ainsi congelées séparément jusqu'à l'analyse. Pour cette étude nous n'avions accès qu'aux tissus prélevés sur les femelles gestantes.

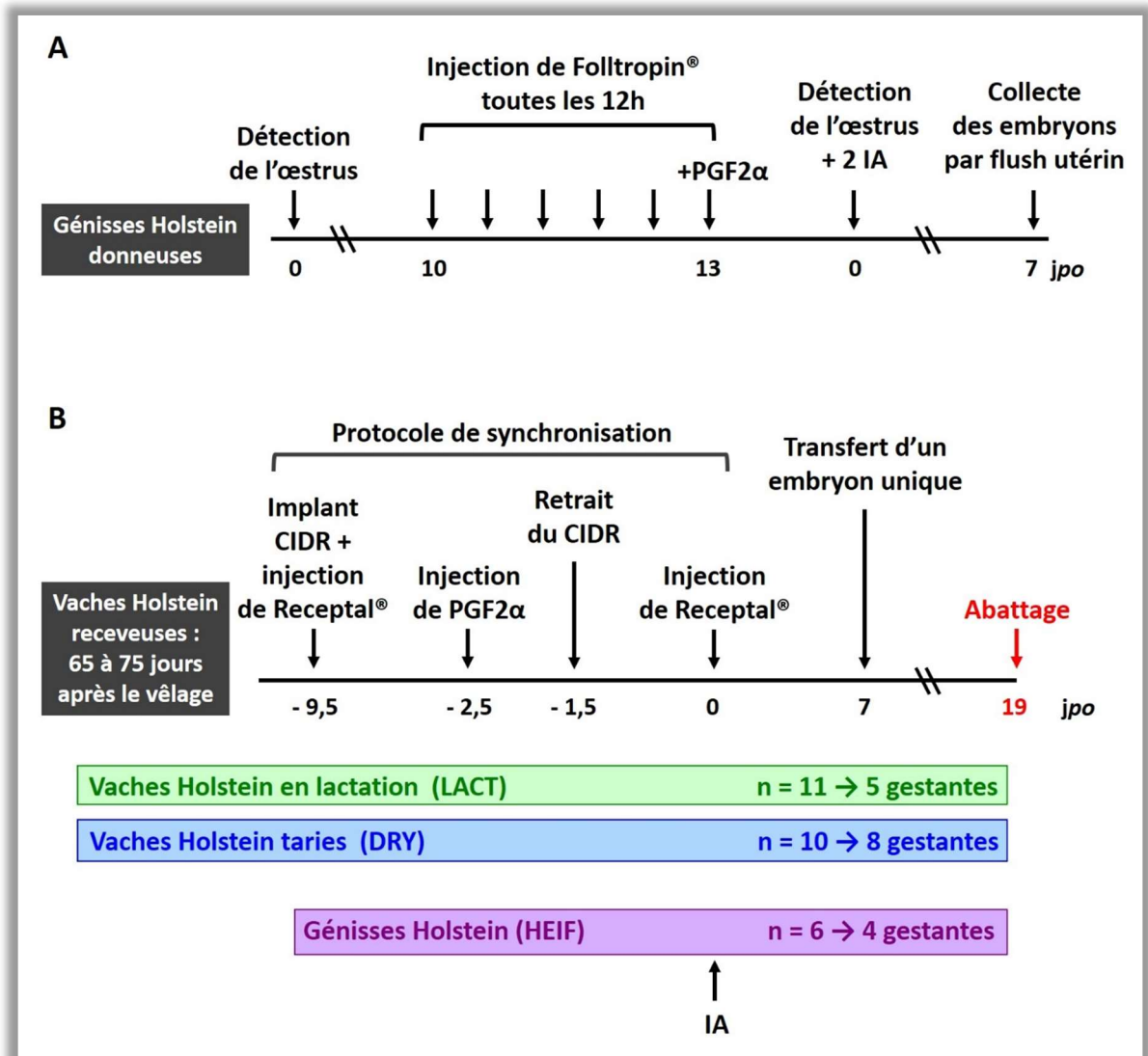


Figure 45 : Design expérimental du modèle métabolique. A- Protocole de production des embryons. B-Protocole de synchronisation, de transfert embryonnaire des vaches en lactation (LACT) ou tarées (DRY), et d'insémination artificielle (IA) des génisses (HEIF). Les animaux ont été abattus à 19 jpo et les tissus CAR et ICAR disséqués avant congélation.

3. Article 1

Maternal metabolism affects endometrial expression of oxidative stress and *FOXL2* genes in cattle

A. Lesage-Padilla, N. Forde, M. Poirée, G. D. Haley, C. Giraud Delville, P. Reinaud, C. Eozenou, A. Vitorino-Carvalho, M. Raliou, J-F. Oudin, C. Richard, M. I. Sheldon, G. Charpigny, P. Lonergan and O. Sandra

Soumis à PlosOne, en révision

1 **Maternal metabolism affects endometrial expression of**
2 **oxidative stress and *FOXL2* genes in cattle**

3 Audrey Lesage-Padilla¹, Niamh Forde^{2#}, Mélanie Poirée¹, Gareth D. Healey³, Corinne
4 Giraud-Delville¹, Pierrette Reinaud¹, Caroline Eozenou¹, Anaïs Vitorino Carvalho¹, Laurent
5 Galio¹, Mariam Raliou¹, Jean-François Oudin¹, Christophe Richard¹, I. Martin Sheldon³,
6 Gilles Charpigny¹, Pat Lonergan², Olivier Sandra^{1*}

7 ¹UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350, Jouy en Josas, France.

8 ²School of Agriculture and Food Science, University College Dublin, Dublin, Ireland.

9 ³Institute of Life Science, Swansea University Medical School, Swansea University, Swansea,
10 SA2 8PP, UK.

11 [#] Division of Reproduction and Early Development, Leeds Institute of Cardiovascular and
12 Molecular Medicine, School of Medicine, University of Leeds, Clarendon Way, Leeds, LS2
13 9JT, United Kingdom.

14

15

16

17 ^{*}Corresponding author

18 Email: olivier.sandra@inra.fr

19

20 **Abstract**

21 Intensive selection for milk production has led to reduced reproductive efficiency in
22 high-producing dairy cattle. The impact of intensive milk production on oocyte quality as well
23 as early embryo development has been established but few analyses have addressed this
24 question at the initiation of implantation, a critical milestone ensuring a successful pregnancy
25 and normal post-natal development. Our study aimed to determine if contrasted maternal
26 metabolism affects the previously described sensory properties of the endometrium to the
27 conceptus in cattle. Following embryo transfer at Day 7 post-oestrus, endometrial caruncular
28 (CAR) and intercaruncular (ICAR) areas were collected at Day 19 from primiparous
29 postpartum Holstein-Friesian cows that were dried-off immediately after parturition (i.e.,
30 never milked; DRY) or milked twice daily (LACT). Gene quantification indicated no
31 significant impact of lactation on endometrial expression of transcripts previously reported as
32 conceptus-regulated (*PLET1*, *PTGS2*, *SOCS6*) and interferon-tau stimulated (*RSAD2*, *SOCS1*,
33 *SOCS3*, *STAT1*) factors or known as female hormone-regulated genes (*FOXL2*, *SCARA5*,
34 *PTGS2*). Compared with LACT cows, DRY cows exhibited higher mRNA levels for *FOXL2*
35 transcription factor and lower mRNA levels for oxidative stress-related genes (*CAT*, *SOD1*,
36 *SOD2*). *In vivo* and *in vitro* experiments highlighted that neither interferon-tau nor *FOXL2*
37 were involved in transcriptional regulation of *CAT*, *SOD1* and *SOD2*. In addition, our data
38 showed that variations in maternal metabolism had a higher impact on gene expression in
39 ICAR areas. Collectively, our findings prompt the need to fully understand the extent to
40 which modifications in endometrial physiology drive the trajectory of conceptus development
41 from implantation onwards when maternal metabolism is altered.

42

43

44

45 **Introduction**

46 During recent decades, dairy cattle have been selected in order to improve milk
47 production, leading to an associated decrease in fertility [1]. Greater milk production has been
48 associated with physiological disturbances that accentuate negative energy balance during
49 early lactation [2]. In high-producing dairy cows, fertilization rate has been shown to be as
50 high as 80-90%, but only about 40% of inseminations result in the birth of a calf, with 70% of
51 pregnancy failures occurring during the pre-implantation period [3]. Indeed, in a review of
52 fertilisation and embryo quality in dairy cows, it was reported that only approximately 50% of
53 embryos are still viable by Day 7 [4]. Milk production has been shown to affect not only the
54 production of oocytes but also embryo metabolism during conceptus free-floating life [5].
55 When the impact of lactation on oocyte quality is circumvented by the use of embryo transfer
56 in lactating recipient females, pregnancy rate is improved [6–8]. Other experiments in which
57 embryos were transferred at Day 7 post-oestrus have shown that pregnancy rate is reduced in
58 lactating cows compared with heifers or dry cows [9–11]. In addition to decreasing fertility,
59 alterations in maternal metabolism during pregnancy have also been reported to affect ante
60 natal programming of production traits in offspring [12]. Thus, endometrial quality is critical
61 for implantation and pregnancy outcome. As a biological dynamic interface, the endometrium
62 acts as a biological sensor of embryo quality that drives the developmental trajectory of the
63 conceptus [13]. Thus, endometrial quality appears critical for pregnancy as well as post-natal
64 issues.

65 Implantation is a critical step of pregnancy [14] and is defined as the establishment of
66 cellular and permanent interactions between a receptive endometrium and a competent and
67 synchronised embryo [15]. At implantation, regulation of endometrial gene expression result
68 from a combination of biological processes that involve actions of maternal signals, impact of
69 embryo-secreted factors and cellular interactions between the conceptus and the endometrium.

70 In ruminants including cattle, interferon-tau (IFNT) has been reported as the major signal of
71 maternal recognition of pregnancy [16,17]. The spatio-temporal secretion of IFNT is
72 restricted to the trophoctoderm during the elongation phase of the conceptus [18]. In the ovine
73 and bovine species, expression patterns of endometrial genes have been intensively
74 investigated by our laboratory and others using in vitro and in vivo experimental models
75 associated with high-throughput analyses and candidate gene approaches. Determining
76 variations in gene expression during estrous cycle and early pregnancy allow a classification
77 of endometrial genes in three major categories namely (i) conceptus regulated gene
78 expression that involves IFNT, making these genes members of classical and non-classical
79 interferon-regulated genes such as the STAT1-SOCS pathway thought to play critical
80 functions during implantation in cattle [19,20], (ii) conceptus regulated and IFNT-
81 independent expression that is modified by still unknown or already identified conceptus-
82 produced factors (e. g. cortisol, prostaglandins [21]) such as *SOCS6* [22] and *PLET1* [23], two
83 genes highly expressed in the luminal epithelial cells when apposition initiates, and (iii)
84 expression that is not affected by the presence of the conceptus but is variable across the
85 estrous cycle (e. g. under the influence of female hormones including ovarian steroids
86 [16,24,25] such as the scavenger receptor *SCARA5* [23], the key enzyme in prostaglandin
87 biosynthesis *PTGS2* [26,27], and *FOXL2*, a key transcription factor of the ovary and recently
88 characterized in the bovine endometrium [28]. These three categories of regulated genes
89 contribute to endometrial receptivity, conceptus elongation and implantation and their
90 perturbed expression may lead to detrimental effects on establishment, progression and
91 outcome of pregnancy [13].

92 After calving, dairy cows undergo metabolic adjustments that are associated with the
93 transition from pregnancy to lactation. In order to meet the increasing demand for energy in
94 early lactation, shifts in nutrient distribution have been described [29]. In this context, the

95 imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and the availability of
96 antioxidant defences during early lactation may expose cows to oxidative stress observed in
97 blood plasma [30]. In mice, ROS may negatively impact embryonic metabolism leading to
98 pregnancy complications and long-term modifications of offspring metabolism [31]. Activity
99 of antioxidant enzymes involved in the regulation of oxidative stress (catalase, CAT; super
100 oxide dismutase 1, SOD1; super oxide dismutase 2, SOD2) has been reported to vary in ovine
101 endometrium during the peri-implantation period [32] and with endocrine milieu in the
102 endometrium of beef cows at Day 7 of the oestrous cycle [33]. Interestingly, in immortalized
103 granulosa cells, *SOD2* gene expression has been shown to be affected by FOXL2 [34].
104 Nevertheless, when variations in maternal metabolism are considered, data relating to the
105 regulation of these enzymes in the endometrium are lacking.

106 Considering this background, our study aimed to determine if maternal metabolism
107 has distinct effects on the two areas that constitute the bovine endometrium at the time of
108 implantation. In ruminants, endometrial morphology is characterised by caruncular (CAR)
109 and intercaruncular areas (ICAR), both essential for supporting pregnancy. Caruncular
110 endometrium is represented by small sparse aglandular structures, whereas intercaruncular
111 endometrium contains endometrial glands the secretions of which are critical for conceptus
112 elongation [35]. High-throughput data have highlighted that endometrial CAR and ICAR
113 areas exhibit a site-specific response to the presence of the implanting conceptus in normal or
114 perturbed pregnancies [22,23,28,36–38]. In this study, we used a novel model of age-matched
115 pregnant primiparous postpartum lactating or non-lactating dairy cows combined with embryo
116 transfer [39]. At Day 19 post-oestrus, we analysed the expression of genes known to be
117 deeply affected in the endometrium when implantation occurs (i) conceptus-regulated and
118 IFNT-Stimulated genes (ISG) namely *RSAD2* [23,40] and three members of the STAT-SOCS
119 transduction pathway (*STAT1*, *SOCS1*, *SOCS3*) [22,41]; (ii) conceptus-regulated but IFNT-

120 independent genes, namely *PLET1*, *PTGS2* and *SOCS6*, and (iii) female hormone-regulated
121 genes including *SCARA5* and *FOXL2* as well as *CAT*, *SOD1* and *SOD2*, three genes encoding
122 enzymes with critical functions in oxidative stress regulation. For these three genes,
123 expression in the bovine endometrium during implantation process and regulation by IFNT
124 was first documented.

125

126 **Materials and Methods**

127 **Animal models**

128 All experiments were conducted in accordance with the European Community
129 Directive 2010/63/EU revising Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for
130 scientific purposes. Animal procedures described in Experiments 1 and 2 were licensed by the
131 Department of Health and Children, Ireland, in accordance with the Cruelty to Animals Act
132 (Ireland 1876) and were sanctioned by the Animal Research Ethics Committee of University
133 College Dublin. Animal procedures reported for endometrial biopsy collection were approved
134 by the Ethical Committee of Animal Experimentation of INRA and AgroParisTech (CEEA 45
135 “COMETHEA”; reference APAFIS#596) with authorization subsequently granted by the
136 French Ministry of Education and Scientific Research (reference 2015050417061568).

137

138 *Experiment 1: Impact of contrasted maternal metabolism on endometrial gene*
139 *expression modifications at implantation.*

140 Twenty-one primiparous Holstein-Friesian cows and six Holstein-Friesian heifers
141 (HEIF) were enrolled onto this study as previously described [39]. At calving, cows were
142 randomly assigned to one of two groups: lactating (LACT, n = 11) or non-lactating (DRY, n =
143 10). From calving, animals in the LACT group were milked twice per day (0700 and 1600

144 hours), while those in the DRY group were dried-off immediately after calving (i.e., never
145 milked) as described by Forde *et al.* [39]. All animals were synchronised 65 to 75 days after
146 calving using an EAZI-BREED™ CIDR® cattle insert in conjunction with prostaglandin F2α
147 (Zoetis, Parsippany-Troy Hills, New Jersey, USA). Single grade 1 Day 7 embryos from
148 superovulated donor heifers were transferred to LACT and DRY cows. As a control, HEIF
149 were artificially inseminated. Blood samples were taken from the jugular vein into plain red-
150 topped vacutainer tubes for serum collection. Progesterone serum concentrations on Day 19
151 were determined according to Carter *et al.* [42].

152 The day of oestrus was considered Day 0 and all females were slaughtered at Day 19,
153 coinciding with the initiation of implantation in cattle. Uteri were collected and flushed and,
154 when present, recovered concepti were observed by microscopy to confirm the stage of
155 development [43]. From pregnant animals (HEIF n = 4; LACT n = 5; DRY n = 8),
156 endometrial CAR and ICAR areas were dissected from the uterine horns ipsilateral to the
157 corpus luteum as previously described [23]. Tissue samples were snap frozen in liquid
158 nitrogen and stored at -80°C prior to extraction.

159

160 *Experiment 2: Expression of oxidative stress enzymes during the oestrous cycle*
161 *and early pregnancy.*

162 In order to provide insights on gene expression of antioxidant enzymes in bovine
163 endometrium, cross-bred heifers were collected at two days of the oestrous cycle (active luteal
164 phase and luteolysis) as well as during pregnancy recognition and implantation as previously
165 published [28]. Heifers were synchronized and artificially inseminated as formerly described
166 [44]. The day of oestrus was considered Day 0 and heifers were slaughtered on Day 16
167 (cyclic: n = 5; pregnant: n =4) or on Day 20 (cyclic: n = 6; pregnant: n = 5). Uteri were
168 collected from pregnant and cyclic animals, they were flushed and, when present, recovered

7

169 concepti were observed by microscopy to confirm the stage of development [43]. Endometrial
170 CAR and ICAR areas were dissected from the uterine horns ipsilateral to the corpus luteum
171 [23]. Tissue samples were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C prior to
172 extraction.

173

174 *Experiment 3: FOXL2 overexpression in primary cultures of bovine endometrial* 175 *cells*

176 In order to determine if FOXL2 regulates gene expression of enzymes involved in the
177 regulation of oxidative stress, we collected endometrial biopsies during the active luteal
178 phase, at Day 15 of the oestrous cycle when endometrial expression of *FOXL2* was reported
179 to be low [28]. Three Holstein heifers (n=3) were sampled, that had been synchronized using
180 Creastar method, EAZI-BREED™ CIDR® cattle insert (Zoetis). From each heifer, one
181 endometrial biopsy was sampled and used for deriving primary cultures of fibroblasts and
182 glandular epithelial cells as previously reported [23]. Fibroblasts and epithelial cells were
183 cultured separately for each heifer, leading to 3 independent biological replicates for each cell
184 type. Endometrial cells were cultured for 24 h on 12-well plates (TPP, Trasadingen,
185 Switzerland). Fibroblasts and epithelial cells were transfected with 0.5 µg of pSG5 plasmid
186 (mock) or pSG5-FOXL2 plasmid (kindly provided by M. Pannetier; INRA, Jouy-en-Josas,
187 France; [45]), using CombiMag transient reagent (Oz Biosciences, Marseille, France)
188 according to the manufacturer's instructions. Transfected cells were lysed after 24 h using
189 Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Cell lysates were frozen and
190 stored at -80°C for gene expression analyses.

191 For determining FOXL2 localization by immunocytochemistry, fibroblasts and
192 glandular epithelial cells were cultured using a Lab-tech chamber slide system (Sigma-
193 Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) and transiently transfected as described above. Cells were

194 fixed for 10 min at room temperature in PAF 4% (Sigma-Aldrich) and washed in PBS
195 (Sigma-Aldrich). Slides were incubated in citrate buffer (sodium citrate 0.01 M, pH 6) for 5
196 min at room temperature then for 10 min at 80°C. Endogenous peroxidase activity was
197 quenched by 0.01% H₂O₂ (Sigma-Aldrich) treatment for 30 min. Cells were incubated with a
198 rabbit anti-FOXL2 purified antibody (dilution 1:250; [28]) in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4
199 with 2% bovine serum albumin [BSA] and 1% Normal Donkey Serum) overnight at 4°C.
200 After washes in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4 with 2% BSA), slides were incubated with
201 an anti-rabbit biotinylated secondary antibody (dilution 1:1000; Ab6720, Abcam, Cambridge,
202 UK) for 1 h at room temperature. Cells were washed in phosphate buffer containing 2% BSA
203 and incubated for 1 h with ABC Vector kit (Vectastain Elite ABC kit, Vector Labs,
204 Peterborough, UK) in Tris buffer (Tris 50 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.5). Slides were washed,
205 incubated for 5 min with Diaminobenzidine-Nickel in Tris buffer then they were mounted
206 with Eukitt medium (Sigma-Aldrich). Nanozoomer Digital Pathology System was used to
207 obtain images that were analysed using the NDP View software (Nanozoomer Digital
208 Pathology Virtual Slide software, Hamamatsu, Japan).

209

210 *Experiment 4: Treatment of bovine endometrial cell cultures with interferon-tau*
211 *(IFNT)*

212 In order to evaluate the impact of IFNT on the expression of genes encoding
213 antioxidant enzymes, we used primary populations of epithelial and fibroblast cells that were
214 isolated from bovine endometrium collected from cyclic mixed breed beef cows on Day 11-17
215 post-oestrus, as previously described [46]. During this period of the estrous cycle,
216 endometrium has been shown to strongly react to conceptus secretions including IFNT
217 [20,44]. The endometrial cells were cultured in medium containing RPMI-1640 Medium
218 [Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France], supplemented with 10% heat inactivated

219 Fetal Bovine Serum [Sigma-Aldrich], 1% Penicillin-Streptomycin [Sigma-Aldrich], 1%
220 Amphotericin B [Sigma-Aldrich]). The epithelial and fibroblast cells were each treated with
221 control medium or medium containing ovine recombinant IFNT (100 ng/ml or 1000 ng/ml)
222 for 30 min, 2 h or 24 h [23,41]. Bovine endometrial cells were washed with Dulbecco's
223 Phosphate Buffered Saline with MgCl₂ and CaCl₂ (Sigma-Aldrich) and lysed using Trizol
224 reagent (Life Technologies). Cell lysates were frozen and stored at -80°C before analysis.
225 Data were generated using stromal and epithelial cells isolated from four independent
226 animals.

227

228 **Protein extraction and Western blot analyses**

229 FOXL2 protein level was investigated from endometrial ICAR and CAR protein
230 extracts (experiment 1; n = 3 animals/condition). Frozen ground tissue (250 mg) was
231 dispersed and sonicated in 1 ml of a cold lysis buffer at pH 7.4 containing 50 mM Hepes, 150
232 mM NaCl, 5 mM EDTA, 16 mM 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-2-hydroxy-1-
233 propanesulfonate, 1mM benzamidine-HCl, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml
234 soybean trypsin inhibitor, 10 µg/ml leupeptin and 10 µg/ml aprotinin. Protein quantification
235 was performed with the Bio-rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, California, USA) using
236 BSA as the standard (Sigma Aldrich).

237 Western blot immunoassays were processed with 25 µg of total protein extract
238 electrophoresed in SDS-10% polyacrylamide gel and onto a Hybond-P, polyvinylidene
239 difluoride membrane (Trans-blot® Turbo Midi Size PVDF Membrane; Bio-Rad) with Trans-
240 blot® Turbo (Bio-Rad) system. Membranes were first incubated with a rabbit anti-FOXL2
241 purified antibody generated against a peptide (sequence: WDHDSKTGALHSRLDL)
242 corresponding to the C-terminal conserved region of mammalian FOXL2 (CASLO
243 Laboratory, Lyngby, Denmark; [28]) in a solution containing 20 mM Tris-HCl, 500 mM

10

244 NaCl, (pH 7.6), 0.1% (wt/vol) Tween 20 containing 5% (wt/vol) low-fat milk (2 µg
245 antibody/ml). Then, membranes were incubated with a biotinylated donkey anti-rabbit IgG
246 antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA). Blots were developed
247 for 1 h using the Vectastain Elite ABC peroxidase complex 1:1000 diluted (Vectastain Elite
248 ABC kit; Vector Labs). Immunoreactive signals were revealed with ECL2 western blotting
249 detection kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). After stripping,
250 GAPDH protein was assessed as a loading control using a rabbit polyclonal anti-GAPDH
251 antibody (Sigma-Aldrich) and donkey peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (Interchim,
252 San Diego, California, USA). The molecular weights of the identified proteins were
253 calculated using the ProSieve HyperPage Meridian (Bioline, London, UK).

254

255 **Total RNA extraction**

256 Total RNA were isolated by homogenization using Trizol reagent (Life Technologies)
257 as published previously [23]. All RNA samples were purified using Qiagen columns
258 integrating a DNase step (RNeasy mini kit; Qiagen, Hilden, Germany). Quality and integrity
259 of purified total RNA were determined using an Agilent 2100 Bioanalyzer (@BRIDGE-ICE
260 platform, INRA, Jouy-en-Josas, France). Total RNA samples were stored at -80°C prior to
261 analysis.

262

263 **Real time RT-PCR**

264 Purified total RNA samples were used for gene quantification using Real Time-PCR
265 (RT-qPCR). One µg of total RNA was reverse transcribed into cDNA with Superscript II
266 enzyme (Life Technologie) in a 20 µl-volume. RT-qPCR reactions were carried out with
267 Master Mix SYBR Green and Step One Plus system (Applied Biosystem, Foster city,

268 California, USA). Primers (Eurogentec, Liège, Belgium) were designed (Primer express
269 version 2.0 software; Applied Biosystem) to specifically amplify housekeeping genes
270 (*C2ORF29*, *GAPDH*, *RPL19*, *SLC30A6*, *SUZ12*) and target genes (S1 Table).

271

272 **Statistical analyses**

273 Quantification of the amount of target mRNA relative to that of normalizer genes was
274 calculated using Qbase plus software (Biogazelle; Zwijnaarde, Belgium) according to the
275 relative standard curve method [47]. Normalized PCR data were processed using the Kruskal-
276 Wallis method using the plug-in Coin (COnditional INference procedures in a Permutation
277 Test Framework; Package Rcmdr) associated with pairwise t-test (R[®] application V3.0.1).
278 Principal Component Analysis (PCA) were carried out in Excel using the XLSTAT software
279 (Addinsoft, Paris France).

280

281 **Results**

282 **Endometrial expression of conceptus-regulated genes is not** 283 **affected by maternal metabolism at implantation**

284 During early pregnancy, the conceptus impacts endometrial physiology through
285 cellular contact and secretions that include IFNT in ruminants. We investigated the impact of
286 contrasted maternal metabolism on transcriptional expression of a selection of conceptus-
287 regulated genes in endometrial CAR and ICAR areas. Amongst conceptus-regulated genes,
288 *RSAD2*, *STAT1*, *SOCS1* and *SOCS3* are IFNT-dependent genes [22,41,48] whereas *SOCS6*
289 and *PLET1* are IFNT-independent genes [22,23]. Variation in maternal metabolism did not
290 significantly affect endometrial expression of these genes on Day 19 of pregnancy (Fig 1).

291

292 **Fig. 1. Expression of conceptus-regulated genes in bovine endometrium at implantation.**

293 Caruncular (CAR) and intercaruncular (ICAR) endometrium was collected from Holstein
294 heifers (HEIF, white; n = 3), lactating (LACT, light grey; n = 5) and non-lactating (DRY, dark
295 grey; n = 8) cows at Day 19 post-oestrus. Gene expression was quantified by real-time RT-
296 PCR using *C2ORF29*, *GAPDH* and *SLC30A6* as housekeeping genes determined by Qbase
297 plus software. Data are means \pm SD.

298

299 ***FOXL2* gene expression at implantation varies with maternal**

300 **metabolism**

301 Maternal regulation of endometrial gene expression has been shown to be essential for
302 endometrial receptivity and subsequent embryo implantation. In this model of contrasted
303 metabolism, we investigated expression of three endometrial genes known to be regulated by
304 maternal signals but not by the conceptus, namely *SCARA5* [23], *PTGS2* [26,27] and *FOXL2*
305 [28]. Maternal metabolism had no significant effect on *SCARA5* and *PTGS2* mRNA levels in
306 bovine endometrium. *FOXL2* transcript expression was significantly higher in ICAR areas of
307 DRY cows compared with those of LACT cows (2.1 fold, $P < 0.05$) and HEIF (6.1 fold, $P <$
308 0.01) groups. No significant effect of the maternal metabolism on *FOXL2* expression was
309 noticeable in CAR areas (Fig 2A). Similarly, at the protein level, regulation of FOXL2
310 expression was seen with a significantly higher expression of FOXL2 in ICAR areas of the
311 DRY group compared with the two other groups (DRY vs LACT: 3.2 fold, $P < 0.05$; DRY vs
312 HEIF: 8.1 fold, $P < 0.01$; Fig 2B). There was no difference in plasma P4 concentrations
313 between groups and *FOXL2* mRNA expression in CAR and ICAR areas was not correlated
314 with P4 blood concentrations (Fig 2C and 2D).

315

316 **Fig 2. Expression of maternally-regulated genes in bovine endometrium at implantation.**
317 Caruncular (CAR) and intercaruncular (ICAR) endometrium and blood samples for
318 progesterone analysis were collected from Holstein heifers (HEIF, white; n = 3), lactating
319 (LACT, light grey; n = 5) and non-lactating (DRY, dark grey; n = 8) cows on Day 19 post-
320 oestrus. (A) *SCARA5*, *PTGS2* and *FOXL2* mRNA expression in bovine endometrium
321 quantified by real-time RT-PCR using *C2ORF29*, *GAPDH* and *SLC30A6* as housekeeping
322 genes determined by Qbase plus software. (B) Quantification of *FOXL2* protein by western
323 blotting normalized to *GAPDH* protein level.. (C) Circulating progesterone concentration in
324 Holstein heifers, lactating and non-lactating cows. (D) Correlation between *FOXL2* mRNA
325 expression and circulating progesterone concentration in CAR (white circle; n = 16) and
326 ICAR (black circle; n = 16) areas. Data are means \pm SD (P<0.01 **; P<0.05 *).

327

328 **Endometrial *CAT*, *SOD1* and *SOD2* expression varies with** 329 **maternal metabolism at implantation**

330 We first determined if *CAT*, *SOD1* and *SOD2* transcripts were expressed in bovine
331 endometrium and regulated during oestrous cycle and early pregnancy (Fig 3A). In CAR and
332 ICAR areas, endometrial expression of *CAT* and *SOD1* mRNA did not significantly differ
333 between Day 16 and Day 20 in cyclic or in pregnant heifers. At Day 20 of pregnancy,
334 endometrial expression of *SOD2* mRNA was significantly higher when compared with Day
335 20 of the oestrous cycle (4.0 fold, P < 0.001 in ICAR; 2.7 fold, P < 0.05 in CAR) or with Day
336 16 of pregnancy (2.3 fold, P < 0.01 in ICAR).

337

338 **Fig 3. Expression of *CAT*, *SOD1* and *SOD2* genes in bovine endometrium.** (A) *CAT*,
339 *SOD1* and *SOD2* mRNA expression in cyclic and pregnant endometrium on Days 16 and 20

340 post oestrous. Caruncular (CAR) and intercaruncular (ICAR) endometrium was collected from
341 cyclic (white; n = 5 at Day 16 and n = 6 at Day 20) and pregnant (grey; n = 4 at Day 16 and n
342 = 5 at Day 20) cross-bred beef heifers. Gene expression was quantified by real-time RT-PCR
343 using *SUZ12* and *SLC30A6* as housekeeping genes determined by Qbase plus software. (B)
344 *CAT*, *SOD1* and *SOD2* mRNA expression in bovine endometrium on Day 19 post-oestrus.
345 CAR and ICAR areas were collected from Holstein heifers (HEIF, white; n = 3), lactating
346 (LACT, light grey; n = 5) and dried-off (DRY, dark grey; n = 8) cows at Day 19 post-oestrus.
347 Gene expression was quantified by real-time RT-PCR using *C2ORF29*, *GAPDH* and
348 *SLC30A6* as housekeeping genes determined by Qbase plus software. Data are means \pm SD
349 ($P < 0.001$ ***; $P < 0.01$ **; $P < 0.05$ *).

350

351 In our model of contrasted maternal metabolism (Fig 3B), *CAT* and *SOD1* mRNA
352 expression was significantly lower in endometrial ICAR areas of DRY cows compared with
353 those of LACT cows or heifers (0.78 and 0.73 fold respectively; $P < 0.05$). Similarly *SOD2*
354 mRNA expression was reduced in the DRY group compared with the LACT group when
355 endometrial CAR and ICAR areas were considered simultaneously (0.78 fold, $P < 0.05$).

356

357 ***CAT*, *SOD1* and *SOD2* mRNA levels are regulated neither by**
358 **interferon-tau nor by FOXL2**

359 To determine if *CAT*, *SOD1* and *SOD2* gene expression was regulated by IFNT,
360 primary cultures of bovine endometrial cells (fibroblasts and glandular epithelial cells) were
361 treated in the presence of 0, 100 or 1000 $\mu\text{g/ml}$ of IFNT for 30 min, 2 h or 24 h. These
362 cultures have been shown to be IFNT-responsive [41] but no significant effect of IFNT was
363 detected on mRNA expression of antioxidant enzymes (Fig 4A).

364 Since FOXL2 was reported to regulate oxidative stress in ovary-related cells [34,49],
365 the effect of FOXL2 on *CAT*, *SOD1* and *SOD2* gene expression was investigated.
366 Overexpression of FOXL2 was reached by transiently transfecting primary cultures of bovine
367 endometrial cells (fibroblasts and glandular epithelial cells). FOXL2 nuclear localization was
368 confirmed by immunocytochemistry in primary cultures of transfected fibroblasts and
369 glandular cells (Fig 4B, left panel). Biological effect of FOXL2 overexpression was
370 confirmed by quantifying *MX2* gene expression. Significant up-regulation of *MX2* mRNA
371 levels was detected in fibroblasts (6.61 fold; $P < 0.01$) and in glandular epithelial cells (2.36
372 fold, $P < 0.01$) (Fig 4B, right panel). FOXL2 overexpression did not significantly affect *CAT*,
373 *SOD1* or *SOD2* mRNA levels in either cell type (Fig 4C).

374

375 **Fig 4. Regulation of *CAT*, *SOD1* and *SOD2* gene expression by interferon-tau (IFNT)**
376 **and FOXL2 in bovine endometrial cells.** (A) Regulation of *CAT*, *SOD1* and *SOD2* mRNA
377 expression by IFNT in primary cultures of bovine endometrial cells. Fibroblasts or glandular
378 epithelial cells were incubated with 0 (circle), 100 (triangle) or 1000 ng/ml (square) of IFNT
379 for 30 min, 2 h and 24 h. (B) Left panel. FOXL2 sub-cellular localization in fibroblasts and
380 glandular epithelial cells in mock-transfection and *FOXL2*-transfection. Scale bar: 100 μ m.
381 Right panel. *MX2* mRNA expression in primary cultures of bovine endometrial cells
382 overexpressing *FOXL2* by transient transfection. (C) *CAT*, *SOD1* and *SOD2* mRNA
383 expression in primary cultures of bovine endometrial cells overexpressing *FOXL2* by transient
384 transfection. Transcript expression is presented as a ratio between “*FOXL2* transfection”
385 condition and “mock transfection” condition (dashed line). Gene expression was quantified by
386 real time RT-PCR using *C2ORF29*, *RPL19* and *SLC30A6* as housekeeping genes determined
387 by Qbase plus software. Data are means \pm SD.

388

389 **Principal Component Analysis (PCA) of endometrial gene**
390 **expression in LACT, DRY and HEIF groups**

391 A two-dimensional PCA was carried out when considering gene expression of the
392 various genes that were analysed according to maternal metabolism. PCA highlighted distinct
393 gene distribution for each endometrial area when maternal metabolic status varies (Fig 5A and
394 5B). Our PCA analysis did not allow the discrimination of LACT, DRY and HEIF groups in
395 CAR areas (Fig 5A). In contrast, the F1 axis discriminates DRY cows from LACT cows and
396 from heifers in ICAR areas (Fig 5B).

397

398 **Figure 5: Gene clustering in the bovine endometrium.** Principal component analysis (PCA)
399 was run to distinguish between Holstein heifers (circle; n = 3), lactating cows (square; n = 5)
400 and non-lactating (triangle; n = 8) cows at Day 19 post-oestrus based on mRNA levels of
401 genes expressed in CAR (A) and ICAR (B) areas. Gene expression was quantified by real-
402 time RT-PCR using *C2ORF29*, *GAPDH* and *SLC30A6* as housekeeping genes determined by
403 Qbase plus software.

404

405 **Discussion**

406 In dairy cattle, poor reproductive performance results in greater economics losses for
407 the farmer. Approximately two-thirds of pregnancy failures are believed to occur during the
408 pre-implantation period [3]. As the maternal tissue layer dedicated to the molecular and
409 cellular interactions with the implanting conceptus, the uterine endometrium drives
410 development of the embryonic disk and elongation of the extra embryonic tissues [13,50] .
411 Environmental stress or maternal physiology disturbances have been reported to affect
412 endometrial function that may in turn impact conceptus development during the peri-

413 implantation period with long-term consequences. In high-producing dairy cows, lactation has
414 been shown to generate metabolic stress due to energy demands associated with milk
415 production [39,51,52]. The present study aimed to determine if modifications in maternal
416 metabolism observed between lactating and non-lactating primiparous cows [39,52,53] impact
417 the expression of genes involved in the regulation of endometrial physiology at the initiation
418 of implantation.

419 Mammalian endometrium has been demonstrated to act as a sensor that can adapt its
420 physiology to variations in embryo quality [54,55]. Recent data in humans have suggested
421 that maternal alterations in endometrial biosensor properties skew the biological response of
422 this tissue to embryo signals [54]. We investigated the impact of a contrasted maternal
423 metabolism on endometrial mRNA levels of conceptus-regulated genes we formerly classified
424 as IFNT-stimulated genes (*RSAD2*, *SOCS1*, *SOCS3* and *STAT1*,) or IFNT-independent genes
425 (*PLET1* and *SOCS6*) in cattle [23,37,41]. We analysed the caruncular (CAR; gland-free zones
426 where placentation occurs) and intercaruncular (ICAR; containing endometrial glands that
427 secrete histotroph critical for extra-embryonic tissue elongation; [35]) areas of the bovine
428 endometrium that have been shown to respond differentially to the presence of the conceptus
429 [22,23,36–38,41]. Our data showed that transcriptional expression of this set of conceptus-
430 regulated genes was not significantly affected in either endometrial area when lactating cows
431 were compared with non-lactating cows. Absence of significant *RSAD2*, *STAT1* and *SOCS1*
432 transcript regulation in endometrium is consistent with formerly published analyses that were
433 run with a dairy cattle model of contrasted metabolism with timed AI [53]. Our data support
434 the notion that lactation-induced changes in metabolic status do not seem to significantly
435 compromise the sensor property of endometrium and its ability to respond to embryonic
436 signals when implantation occurs.

437 Based on data generated in sheep, tight regulation of cellular reactive oxygen species
438 (ROS) at the conceptus-endometrium interface appears critical for implantation and
439 pregnancy outcome. SOD1, SOD2 and CAT enzymes have been suggested to control O₂⁻ and
440 H₂O₂ generation as a means of limiting detrimental impact of oxidative and harmful ROS
441 [32]. The present study showed that *CAT*, *SOD1* and *SOD2* transcripts are expressed in
442 endometrial CAR and ICAR areas of cyclic and pregnant heifers and *SOD2* mRNA levels
443 were significantly up-regulated in ICAR areas of bovine endometrium at Day 20 of
444 pregnancy. Our data are consistent with previous data reporting an increased amount of SOD2
445 in ovine intercaruncular endometrium at implantation [56]. Consequently, association
446 between conceptus implantation and increased *SOD2* gene expression or activity in the
447 endometrium appears to be a conserved feature that could be necessary for the correct
448 progression of pregnancy in ruminants. Interestingly, we showed that increase in *SOD2* gene
449 expression is not a consequence of IFNT action, demonstrating that neither *SOD2* nor *SOD1*
450 or *CAT* can be classified as interferon-stimulated genes.

451 Oxidative stress results from the balance between the production of ROS and the
452 capacity of antioxidant mechanisms to neutralize them in tissues and in blood. Continuous
453 production of ROS results from normal metabolic processes, but it is known that this
454 production rate varies with alterations of metabolic demand. In clinically healthy dairy cows,
455 antioxidant status in the plasma compartment has been shown to reflect variations in maternal
456 metabolism, during the periparturient and lactation periods [57,58]. Our findings show that
457 transcript levels of endometrial *CAT*, *SOD1* and *SOD2* are similar between pregnant LACT
458 cows and the control pregnancy group represented by inseminated heifers. Interestingly,
459 immediate post calving drying-off leads to lower *CAT* and *SOD1* mRNA levels in endometrial
460 ICAR areas of pregnant DRY cows when compared with pregnant LACT cows. This reduced
461 expression of genes encoding antioxidant enzymes suggests a reduction of ROS and oxidative

462 stress in the endometrium of pregnant cows belonging to the DRY group. Our results provide
463 a solid argument that variations in plasma oxidant status of dry or lactating cows during post-
464 partum take also place in the endometrium. Small perturbations of oxidative stress balance
465 through early fetal life can have profound implications for offspring metabolism and cause
466 diseases in adulthood [31,59]. To understand how modifications in endometrial expression of
467 oxidative stress-related genes impact on conceptus development requires longitudinal studies
468 with comprehensive analyses of the redox environment including markers and enzyme
469 activities at the conceptus-uterus interface when pregnancy establishes.

470 The forkhead transcription factor FOXL2 has been established as a master gene for
471 folliculogenesis and maintenance of ovarian function in vertebrates [45,60]. Our previous data
472 have shown that *FOXL2* transcript and protein are expressed in bovine and ovine
473 endometrium and are regulated by progesterone but not by oestradiol [28,61]. The current
474 study demonstrated a significant increase in *FOXL2* transcript and protein expression in
475 endometrial ICAR areas of pregnant dry cows compared with those collected from pregnant
476 lactating cows. Therefore regulation of *FOXL2* gene expression appears to be specific to each
477 endometrial area. Compared with our previous report [28], up-regulated expression of *FOXL2*
478 was not a consequence of a drop in progesterone circulating concentrations which were
479 similar in the three experimental groups. Identifying molecular regulators of *FOXL2*
480 production according to the endometrial cell type in the context of metabolism variations will
481 require complementary experiments.

482 After the pioneering report of Batista *et al.* [34] establishing FOXL2-stimulated *SOD2*
483 expression in a granulosa tumor cell line (KGN cells), subsequent findings have demonstrated
484 that *FOXL2* upregulation promotes granulosa cell accumulation in G1 phase and protects
485 these cells from oxidative damage, notably by stimulating the production of antioxidant
486 molecules [47,62]. Based on these results, we hypothesize a direct link between *FOXL2* and

487 oxidative-related factors in the endometrium of postpartum dairy cows displaying distinct
488 metabolic status. In our bovine model, reduced levels of oxidative stress-related gene
489 transcripts did not correlate with a decrease in *FOXL2* gene expression. Under our
490 experimental conditions, *FOXL2* overexpression did not impact *SOD2*, *SOD1* or *CAT*
491 transcript levels in primary cultures of endometrial fibroblasts or glandular cells. Although
492 interactions between *FOXL2* and oxidative stress regulation cannot be ruled out in the
493 endometrium, this connection is not obvious. A comprehensive approach will be necessary to
494 bring new insights to the biological roles of *FOXL2* in the endometrium.

495 Metabolic disorders have been shown to exert detrimental effects on reproduction as
496 illustrated by impaired uterine receptivity and miscarriage in women [63]. Until recently,
497 dairy cattle have been intensively selected to increase milk production with a significant
498 decline in reproductive performances [64,65] that has been extensively investigated at the
499 level of oocyte and embryo quality [66]. Nevertheless recent published data have shown an
500 increased interest for determining the impact of selection on endometrial physiology of high
501 producing dairy cattle [52,67,68]. These reports have focused on the analysis of endometrial
502 ICAR area, whereas our present data have revealed that expression profiles of a selection of
503 genes are distinct between the endometrial CAR and ICAR areas in the post-partum cow
504 associated with metabolic status. In addition, principal component analyses of gene
505 expression in ICAR areas have also revealed that the group of pregnant DRY cows was
506 distinct from the groups of pregnant LACT cows and HEIF. Consequently, the impact of
507 variations in maternal metabolism appears to be more profound on endometrial areas that
508 contain endometrial glands. Endometrial glands are the main producers of histotroph, critical
509 for conceptus elongation in cattle as well as for successful implantation and progression of
510 pregnancy in mammals [69]. Endometrial cell-specific gene expression and histotroph

511 composition will deserve further studies to shed light on the impact of metabolism on uterine
512 secretions relatively to conceptus development.

513

514 **Conclusion**

515 The present study has demonstrated that maternal metabolism rather than lactation
516 perturbs endometrial function in cattle. ICAR areas have been identified as the endometrial
517 regions more affected by perturbations in maternal metabolism in post-partum cows. We
518 identified *FOXO2* and oxidative stress-related enzymes as genes whose expression was
519 modified by the absence of lactation. Based on our gene expression data in endometrial ICAR
520 areas of these pregnant females, lactating cows were not significantly different from heifers
521 whereas previously published analyses of circulating metabolites (insulin, IGF1, glucose,
522 NEFA) in these same females indicated that lactating cows were distinct from heifers and dry
523 cows during postpartum in the absence of pregnancy [39]. Pregnancy may have brought about
524 modifications in expressed factors and biological functions in the endometrium of lactating
525 cows that were not detected with our candidate gene approach. Certainly more genes and
526 other biological functions in the endometrium are affected, and their identification prompts
527 the need for more comprehensive molecular analyses of this tissue. Considering the driving
528 property of the endometrium on the trajectory of embryo development [13], it appears critical
529 to determine if molecular modifications detected at the endometrial level have an impact on
530 conceptus features that have been shown to react to subtle modifications in dam energy
531 metabolism [5]. These investigations may provide new approaches for nutritional strategies
532 that could alleviate the negative impact of lactation on prenatal programming of adult
533 performances when lactation and pregnancy overlap.

534

535

536 **Acknowledgments**

537 We are grateful to Dr Isabelle Hue (INRA, Jouy-en-Josas, France) and graduate
538 students, postdoctoral scientists, and technical staff at UCD and INRA for assistance with
539 sample collection. We are grateful to the staff of the Unité Commune d'Expérimentation
540 Animale (UCEA, INRA, Leudeville, France) for animal management. We thank Drs Eric
541 Pailhoux and Maëlle Pannetier (INRA, Jouy-en-Josas, France) for providing us *FOXL2*-pSG5
542 and pSG5 plasmids. We thank Kaïs Al-Gubory for helpful discussions and Philippe Bolifraud
543 (INRA, Jouy-en-Josas, France) for his technical help. We thank the ICE platform (Claudia
544 Bevilacqua and Nicolas Crapart, INRA, Jouy-en-Josas, France) for access to the bioanalyzer.

545

546 **References**

- 547 1. Butler WR. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and
548 fertility in postpartum dairy cows. *Livest Prod Sci.* 2003;83: 211–218.
549 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226\(03\)00112-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226(03)00112-X)
- 550 2. Wathes DC, Fenwick M, Cheng Z, Bourne N, Llewellyn S, Morris DG, et al. Influence
551 of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow.
552 *Theriogenology.* 2007;68. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.04.006
- 553 3. Diskin MG, Morris DG. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other
554 Ruminants. *Reprod Domest Anim.* 2008;43: 260–267. doi:10.1111/j.1439-
555 0531.2008.01171.x
- 556 4. Sartori R, Bastos MR, Wiltbank MC. Factors affecting fertilisation and early embryo
557 quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reproduction, Fertility and*
558 *Development.* 2010. pp. 151–158. doi:10.1071/RD09221
- 559 5. Valour D, Degrelle SA, Ponter AA, Giraud-Delville C, Champion E, Guyader-Joly C, et
560 al. Energy and lipid metabolism gene expression of D18 embryos in dairy cows is
561 related to dam physiological status. *Physiol Genomics.* 2014;46: 39–56.
562 doi:10.1152/physiolgenomics.00091.2013
- 563 6. Al-Katanani YM, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Krininger CE, Block J, et al.
564 Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro
565 produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions.
566 *Theriogenology.* 2002;58: 171–182. doi:10.1016/S0093-691X(02)00916-0
- 567 7. Demetrio DGB, Santos RM, Demetrio CGB, Vasconcelos JLM. Factors Affecting
568 Conception Rates Following Artificial Insemination or Embryo Transfer in Lactating

- 569 Holstein Cows. *J Dairy Sci.* 2007;90: 5073–5082. doi:10.3168/jds.2007-0223
- 570 8. Vasconcelos JLM, Demétrio DGB, Santos RM, Chiari JR, Rodrigues CA, Filho OGS.
571 Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology.*
572 2006;65: 192–200. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.030
- 573 9. Hasler JF. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle.
574 *Theriogenology.* 2001;56: 1401–1415. doi:10.1016/S0093-691X(01)00643-4
- 575 10. Chagas e Silva J, Lopes da Costa L, Robalo Silva J. Plasma progesterone profiles and
576 factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle.
577 *Theriogenology.* 2002;58: 51–59. doi:10.1016/S0093-691X(02)00906-8
- 578 11. Wilson RD, Fricke PM, Leibfried-Rutledge ML, Rutledge JJ, Penfield CMS, Weigel
579 KA. In vitro production of bovine embryos using sex-sorted sperm. *Theriogenology.*
580 2006;65: 1007–1015. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.07.007
- 581 12. Gonzalez-Recio O, Ugarte E, Bach A. Trans-generational effect of maternal lactation
582 during pregnancy: a Holstein cow model. *PLoS One. United States;* 2012;7: e51816.
583 doi:10.1371/journal.pone.0051816
- 584 13. Sandra O, Mansouri-Attia N, Lea RG. Novel aspects of endometrial function: A
585 biological sensor of embryo quality and driver of pregnancy success. *Reprod Fertil*
586 *Dev.* 2011;24: 68–79. doi:10.1071/RD11908
- 587 14. Bazer FW, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bayless K. Novel
588 pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in
589 mammals. *Mol Hum Reprod.* 2010;16: 135–152. doi:10.1093/molehr/gap095
- 590 15. Lee KY, DeMayo FJ. Animal models of implantation. *Reproduction.* 2004;128: 679–
591 695. doi:10.1530/rep.1.00340
- 592 16. Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Spencer TE, Wu G. Interferons and
593 progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among
594 novel cell signaling pathways. *Reprod Biol.* 2008;8: 179–211. doi:10.1016/S1642-
595 431X(12)60012-6
- 596 17. Roberts RM, Chen Y, Ezashi T, Walker AM. Interferons and the maternal-conceptus
597 dialog in mammals. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2008. pp. 170–177.
598 doi:10.1016/j.semcdb.2007.10.007
- 599 18. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. Implantation mechanisms:
600 Insights from the sheep. *Reproduction.* 2004;128: 657–668. doi:10.1530/rep.1.00398
- 601 19. Sandra O, Charpigny G, Galio L, Hue I. Preattachment Embryos of Domestic Animals:
602 Insights into Development and Paracrine Secretions. *Annu Rev Anim Biosci. United*
603 *States;* 2017;5: 205–228. doi:10.1146/annurev-animal-022516-022900
- 604 20. Spencer TE, Sandra O, Wolf E. Genes involved in conceptus-endometrial interactions
605 in ruminants: Insights from reductionism and thoughts on holistic approaches.
606 *Reproduction.* 2008;135: 165–179. doi:10.1530/REP-07-0327
- 607 21. Spencer TE, Forde N, Lonergan P. Insights into conceptus elongation and
608 establishment of pregnancy in ruminants. *Reprod Fertil Dev.* 2017;29: 84.

- 609 doi:10.1071/RD16359
- 610 22. Carvalho AV, Reinaud P, Forde N, Healey GD, Eozenou C, Giraud-Delville C, et al.
611 SOCS genes expression during physiological and perturbed implantation in bovine
612 endometrium. *Reproduction*. 2014;148: 545–557. doi:10.1530/REP-14-0214
- 613 23. Mansouri-Attia N, Aubert J, Reinaud P, Giraud-Delville C, Taghouti G, Galio L, et al.
614 Gene expression profiles of bovine caruncular and intercaruncular endometrium at
615 implantation. *Physiol Genomics*. 2009;39: 14–27.
616 doi:10.1152/physiolgenomics.90404.2008
- 617 24. Forde N, Carter F, Fair T, Crowe MA, Evans ACO, Spencer TE, et al. Progesterone-
618 Regulated Changes in Endometrial Gene Expression Contribute to Advanced
619 Conceptus Development in Cattle. *Biol Reprod*. 2009;81: 784–794.
620 doi:10.1095/biolreprod.108.074336
- 621 25. Spencer TE, Forde N, Lonergan P. The role of progesterone and conceptus-derived
622 factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. *J Dairy Sci*. 2016;99:
623 5941–5950. doi:10.3168/jds.2015-10070
- 624 26. Charpigny G, Reinaud P, Tamby JP, Creminon C, Martal J, Maclouf J, et al.
625 Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in ovine endometrium during the estrous cycle
626 and early pregnancy. *Endocrinology*. 1997;138: 2163–2171. doi:10.1210/en.138.5.2163
- 627 3927. Arosh J a, Parent J, Chapdelaine P, Sirois J, Fortier M a. Expression of
628 cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue
629 during the estrous cycle. *Biol Reprod*. 2002;67: 161–169.
630 doi:10.1095/biolreprod67.1.161
- 631 28. Eozenou C, Carvalho A V., Forde N, Giraud-Delville C, Gall L, Lonergan P, et al.
632 FOXL2 Is Regulated During the Bovine Estrous Cycle and Its Expression in the
633 Endometrium Is Independent of Conceptus-Derived Interferon Tau. *Biol Reprod*.
634 2012;87: 32–32. doi:10.1095/biolreprod.112.101584
- 635 29. Drackley JK. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *J*
636 *Dairy Sci*. 1999;82: 2259–2273. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75474-3
- 637 30. Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. Influence of Body Condition Score
638 on Relationships Between Metabolic Status and Oxidative Stress in Periparturient
639 Dairy Cows. *J Dairy Sci*. Elsevier; 2005;88: 2017–2026. doi:10.3168/jds.S0022-
640 0302(05)72878-2
- 641 31. Igosheva N, Abramov AY, Poston L, Eckert JJ, Fleming TP, Duchon MR, et al.
642 Maternal Diet-Induced Obesity Alters Mitochondrial Activity and Redox Status in
643 Mouse Oocytes and Zygotes. *PLoS One*. Public Library of Science; 2010;5: e10074.
644 Available: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010074>
- 645 32. Al-Gubory KH, Garrel C. Antioxidative signalling pathways regulate the level of
646 reactive oxygen species at the endometrial-extraembryonic membranes interface during
647 early pregnancy. *Int J Biochem Cell Biol*. Elsevier Ltd; 2012;44: 1511–1518.
648 doi:10.1016/j.biocel.2012.06.017
- 649 33. Ramos RS, Oliveira ML, Izaguirry AP, Vargas LM, Soares MB, Mesquita FS, et al.
650 The periovulatory endocrine milieu affects the uterine redox environment in beef cows.

- 651 Reprod Biol Endocrinol. 2015;13: 39. doi:10.1186/s12958-015-0036-x
- 652 34. Batista F, Vaiman D, Dausset J, Fellous M, Veitia R a. Potential targets of FOXL2, a
653 transcription factor involved in craniofacial and follicular development, identified by
654 transcriptomics. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104: 3330–3335.
655 doi:10.1073/pnas.0611326104
- 656 35. Gray CA, Taylor KM, Ramsey WS, Hill JR, Bazer FW, Bartol FF, et al. Endometrial
657 glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. Biol
658 Reprod. 2001;64: 1608–1613. doi:10.1095/biolreprod64.6.1608
- 659 36. Biase FH, Rabel C, Guillomot M, Hue I, Andropolis K, Olmstead CA, et al. Massive
660 dysregulation of genes involved in cell signaling and placental development in cloned
661 cattle conceptus and maternal endometrium. Proc Natl Acad Sci. 2016;113:
662 201520945. doi:10.1073/pnas.1520945114
- 663 37. Mansouri-Attia N, Sandra O, Aubert J, Degrelle S, Everts RE, Giraud-Delville C, et al.
664 Endometrium as an early sensor of in vitro embryo manipulation technologies. Proc
665 Natl Acad Sci U S A. 2009;106: 5687–92. doi:10.1073/pnas.0812722106
- 666 38. Walker CG, Meier S, Littlejohn MD, Lehnert K, Roche JR, Mitchell MD. Modulation
667 of the maternal immune system by the pre-implantation embryo. BMC Genomics.
668 2010;11: 1–13. doi:10.1186/1471-2164-11-474
- 669 39. Forde N, O’Gorman A, Whelan H, Duffy P, O’Hara L, Kelly AK, et al. Lactation-
670 induced changes in metabolic status and follicular-fluid metabolomic profile in
671 postpartum dairy cows. Reprod Fertil Dev. 2015;28: 1882–1892.
672 doi:10.1071/RD14348
- 673 40. Song G, Bazer FW, Spencer TE. Pregnancy and interferon tau regulate RSAD2 and
674 IFIH1 expression in the ovine uterus. Reproduction. England; 2007;133: 285–295.
675 doi:10.1530/REP-06-0092
- 676 41. Carvalho AV, Eozenou C, Healey GD, Forde N, Reinaud P, Chebrou M, et al.
677 Analysis of STAT1 expression and biological activity reveals interferon-tau-dependent
678 STAT1-regulated SOCS genes in the bovine endometrium. Reprod Fertil Dev.
679 2016;28: 459–474. doi:10.1071/RD14034
- 680 42. Carter F, Forde N, Duffy P, Wade M, Fair T, Crowe MA, et al. Effect of increasing
681 progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival
682 and development in beef heifers. Reprod Fertil Dev. Australia; 2008;20: 368–375.
- 683 43. Degrelle SA, Champion E, Cabau C, Piumi F, Reinaud P, Richard C, et al. Molecular
684 evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts.
685 Dev Biol. United States; 2005;288: 448–460. doi:10.1016/j.ydbio.2005.09.043
- 686 44. Forde N, Carter F, Spencer TE, Bazer FW, Sandra O, Mansouri-Attia N, et al.
687 Conceptus-Induced Changes in the Endometrial Transcriptome: How Soon Does the
688 Cow Know She Is Pregnant?1. Biol Reprod. 2011;85: 144–156.
689 doi:10.1095/biolreprod.110.090019
- 690 45. Pannetier M, Renault L, Jolivet G, Cotinot C, Pailhoux E. Ovarian-specific expression
691 of a new gene regulated by the goat PIS region and transcribed by a FOXL2
692 bidirectional promoter. Genomics. 2005;85: 715–726.

- 693 doi:10.1016/j.ygeno.2005.02.011
- 694 46. Cronin JG, Turner ML, Goetze L, Bryant CE, Sheldon IM. Toll-like receptor 4 and
695 MYD88-dependent signaling mechanisms of the innate immune system are essential
696 for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine
697 endometrium. *Biol Reprod.* 2012;86: 51. doi:10.1095/biolreprod.111.092718
- 698 47. Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time
699 PCR data processing. *BMC Bioinformatics.* 2005;6: 62. doi:10.1186/1471-2105-6-62
- 700 48. Mansouri-Attia N, Oliveira LJ, Forde N, Fahey AG, Browne JA, Roche JF, et al.
701 Pivotal role for monocytes/macrophages and dendritic cells in maternal immune
702 response to the developing embryo in cattle. *Biol Reprod.* 2012 Nov 29;87(5):123. doi:
703 10.1095/biolreprod.112.101121.
- 704 49. Benayoun BA, Batista F, Auer J, Dipietromaria A, L'Hôte D, De Baere E, et al.
705 Positive and negative feedback regulates the transcription factor FOXL2 in response to
706 cell stress: evidence for a regulatory imbalance induced by disease-causing mutations.
707 *Hum Mol Genet.* 2009;18: 632–644. Available: <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddn389>
- 708 50. Hue I. Determinant molecular markers for peri-gastrulating bovine embryo
709 development. *Reproduction, fertility, and development.* 2016. pp. 51–65.
710 doi:10.1071/RD15355
- 711 51. Collard BL, Boettcher PJ, Dekkers JC, Petitclerc D, Schaeffer LR. Relationships
712 between energy balance and health traits of dairy cattle in early lactation. *J Dairy Sci.*
713 *United States;* 2000;83: 2683–2690. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)75162-9
- 714 52. Lucy MC, Beck J, Staples CR, Head HH, De La Sota RL, Thatcher WW. Follicular
715 dynamics, plasma metabolites, hormones and insulin-like growth factor I (IGF-I) in
716 lactating cows with positive or negative energy balance during the preovulatory period.
717 *Reprod Nutr Dev. France;* 1992;32: 331–341.
- 718 53. Cerri RLA, Thompson IM, Kim IH, Ealy AD, Hansen PJ, Staples CR, et al. Effects of
719 lactation and pregnancy on gene expression of endometrium of Holstein cows at day 17
720 of the estrous cycle or pregnancy. *J Dairy Sci.* 2012;95: 5657–5675.
721 doi:10.3168/jds.2011-5114
- 722 54. Macklon NS, Brosens JJ. The Human Endometrium as a Sensor of Embryo Quality.
723 *Biol Reprod.* 2014;91: 1–8. doi:10.1095/biolreprod.114.122846
- 724 55. Sandra O, Constant F, Vitorino Carvalho A, Eozénou C, Valour D, Mauffré V, et al.
725 Maternal organism and embryo biosensing: Insights from ruminants. *J Reprod*
726 *Immunol. Elsevier Ireland Ltd;* 2015;108: 105–113. doi:10.1016/j.jri.2014.12.005
- 727 56. Al-Gubory KH, Garrel C, Sugino N, Fowler PA. The conceptus induces a switch in
728 protein expression and activities of superoxide dismutase 1 and 2 in the sheep
729 endometrium during early pregnancy. *Small Rumin Res. Elsevier B.V.;* 2016;141: 77–
730 83. doi:10.1016/j.smallrumres.2016.07.006
- 731 57. Castillo C, Hernandez J, Bravo A, Lopez-Alonso M, Pereira V, Benedito JL. Oxidative
732 status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Vet J.* 2005;169: 286–
733 292. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.02.001>

- 734 58. Omid A, Fathi MH, Parker MO. Alterations of antioxidant status markers in dairy
735 cows during lactation and in the dry period. *J Dairy Res.* 2016; 1–5.
736 doi:10.1017/S0022029916000753
- 737 59. Jarvie E, Hauguel-de-Mouzon S, Nelson SM, Sattar N, Catalano PM, Freeman DJ.
738 Lipotoxicity in obese pregnancy and its potential role in adverse pregnancy outcome
739 and obesity in the offspring. *Clin Sci.* 2010;119: 123–129.
- 740 60. Elzaat M, Todeschini AL, Caburet S, Veitia RA. The genetic make-up of ovarian
741 development and function: the focus on the transcription factor FOXL2. *Clinical*
742 *Genetics.* 2017. pp. 173–182. doi:10.1111/cge.12862
- 743 61. Eozenou C, Mauffre V, Reinaud P, Camous S, Bolifraud P, Albert JP, Shimizu T,
744 Miyamoto A, Pannetier M, Constant F, Al-Gubory KH SO. FOXL2 is inhibited by
745 progesterone in ruminant endometrium. *Society for the Study of Reproduction, Biology*
746 *of Reproduction.* 2013. p. Suppl., pp.337, 2013. doi:<hal-01019549>
- 747 62. Benayoun BA, Georges AB, L'Hôtel D, Andersson N, Dipietromaria A,
748 Todeschini A-LL, et al. Transcription factor FOXL2 protects granulosa cells from
749 stress and delays cell cycle: role of its regulation by the SIRT1 deacetylase. *Hum Mol*
750 *Genet.* 2011;20: 1673–1686. doi:10.1093/hmg/ddr042
- 751 63. Broughton DE, Moley KH. Obesity and female infertility: potential mediators of
752 obesity's impact. *Fertil Steril. Elsevier;* 2017; doi:10.1016/j.fertnstert.2017.01.017
- 753 64. Friggens NC, Disenhaus C, Petit H V. Nutritional sub-fertility in the dairy cow:
754 towards improved reproductive management through a better biological understanding.
755 *Animal.* 2010;4: 1197–1213. doi:doi:10.1017/S1751731109991601
- 756 65. Norman HD, Wright JR, Hubbard SM, Miller RH, Hutchison JL. Reproductive status
757 of Holstein and Jersey cows in the United States. *J Dairy Sci. United States;* 2009;92:
758 3517–3528. doi:10.3168/jds.2008-1768
- 759 66. Leroy JLMR, Valckx SDM, Jordaens L, De Bie J, Desmet KLJ, Van Hoeck V, et al.
760 Nutrition and maternal metabolic health in relation to oocyte and embryo quality:
761 Critical views on what we learned from the dairy cow model. *Reproduction, Fertility*
762 *and Development.* 2015. pp. 693–703. doi:10.1071/RD14363
- 763 67. Thompson IM, Cerri RLA, Kim IH, Ealy AD, Hansen PJ, Staples CR, et al. Effects of
764 lactation and pregnancy on metabolic and hormonal responses and expression of
765 selected conceptus and endometrial genes of Holstein dairy cattle. *J Dairy Sci.*
766 *Elsevier;* 2012;95: 5645–5656. doi:10.3168/jds.2011-5113
- 767 68. Wathes DC, Cheng Z, Chowdhury W, Fenwick MA, Fitzpatrick R, Morris DG, et al.
768 Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the
769 uterus of postpartum dairy cows. *Am Physiol Soc.* 2009;39: 1–13.
770 doi:10.1152/physiolgenomics.00064.2009.
- 771 69. Spencer TE, Dunlap KA, Filant J. Comparative developmental biology of the uterus:
772 Insights into mechanisms and developmental disruption. *Mol Cell Endocrinol. Elsevier*
773 *Ireland Ltd;* 2012;354: 34–53. doi:10.1016/j.mce.2011.09.035
- 774

Fig1

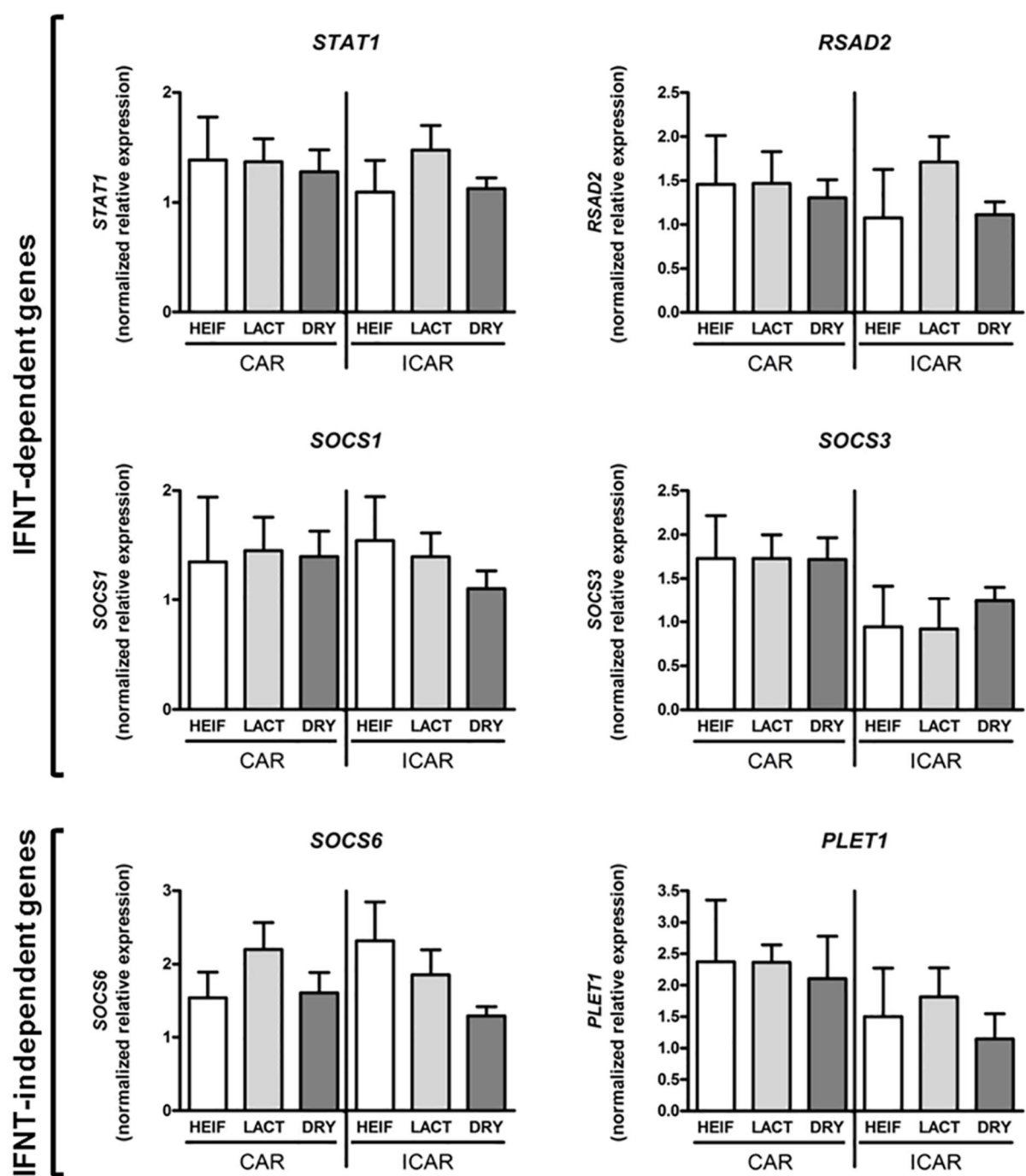


Fig2

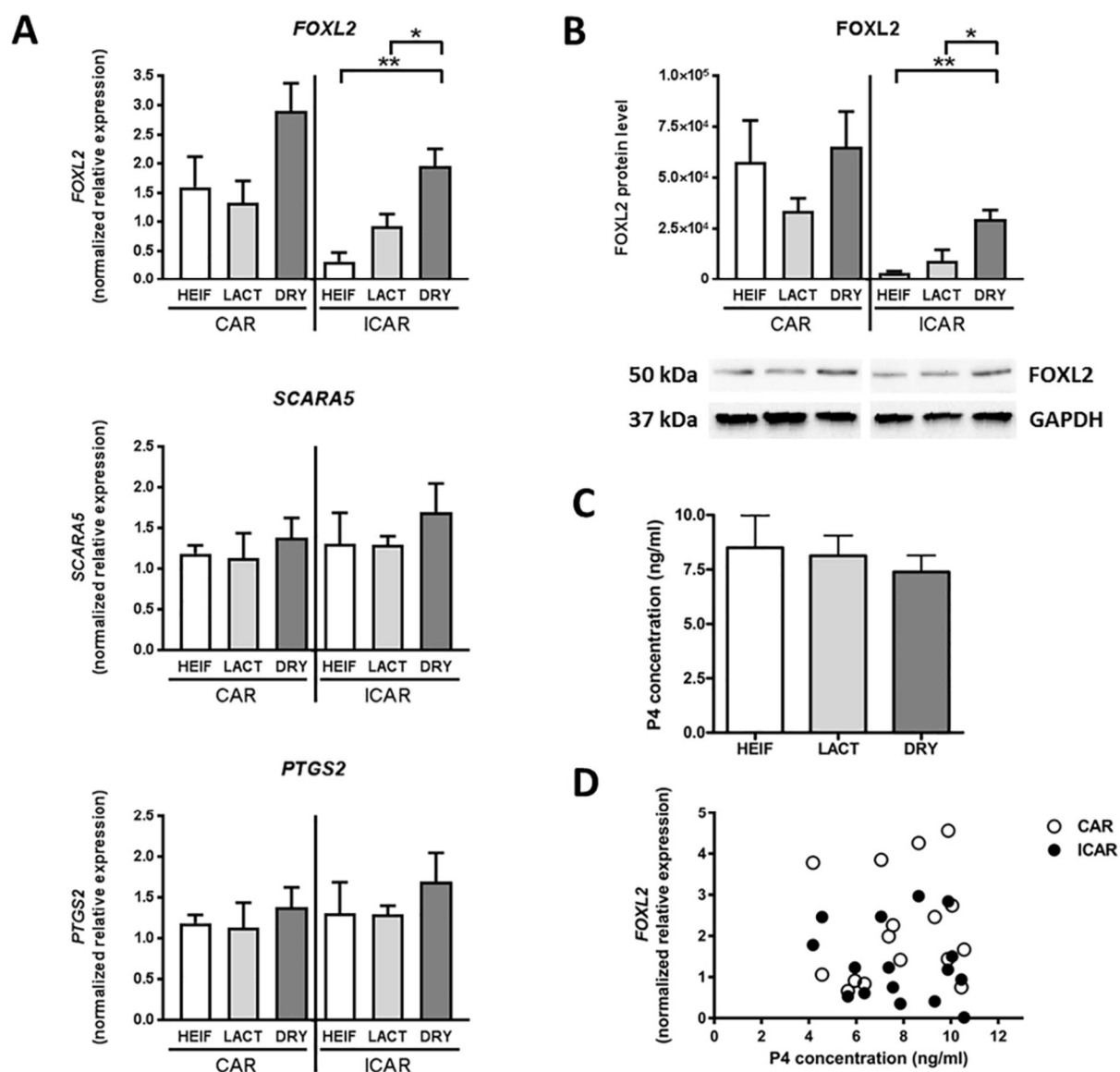
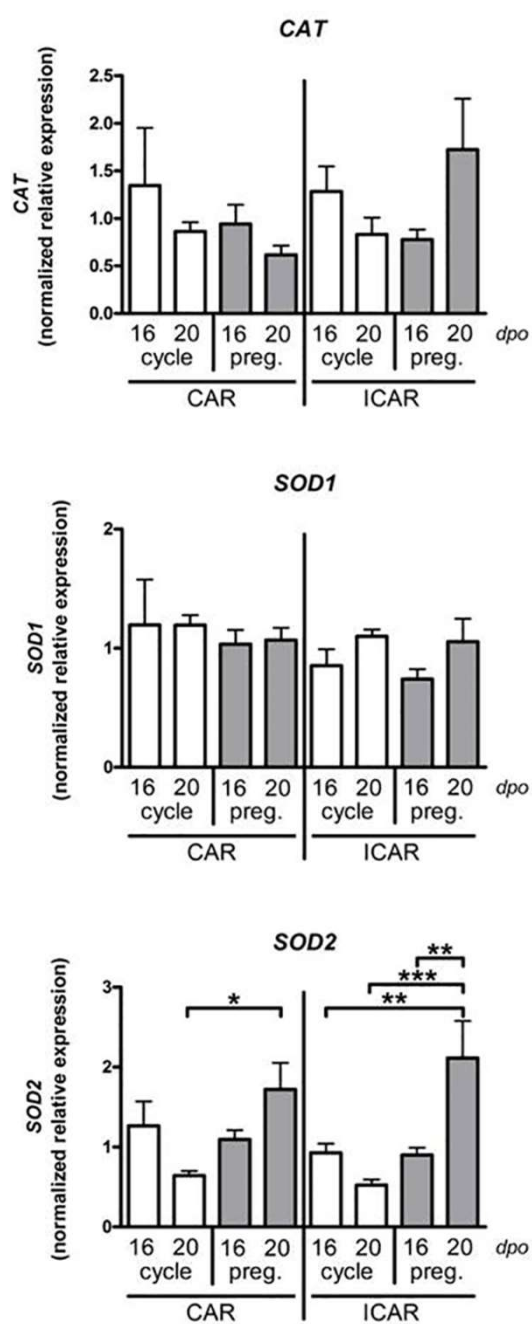


Fig3

A



B

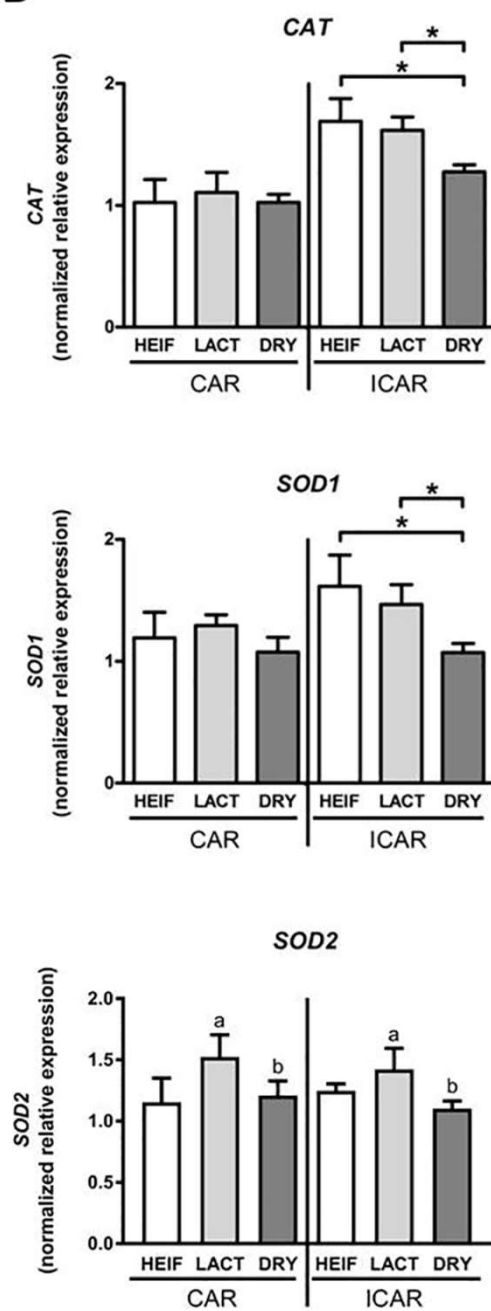


Fig4

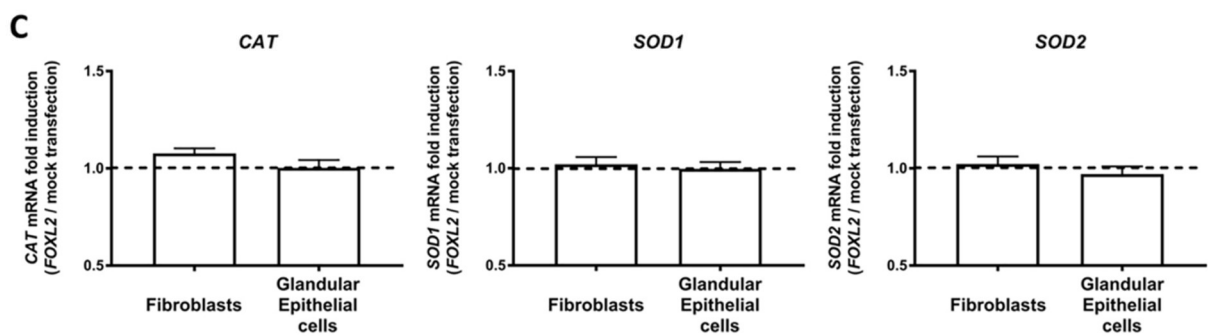
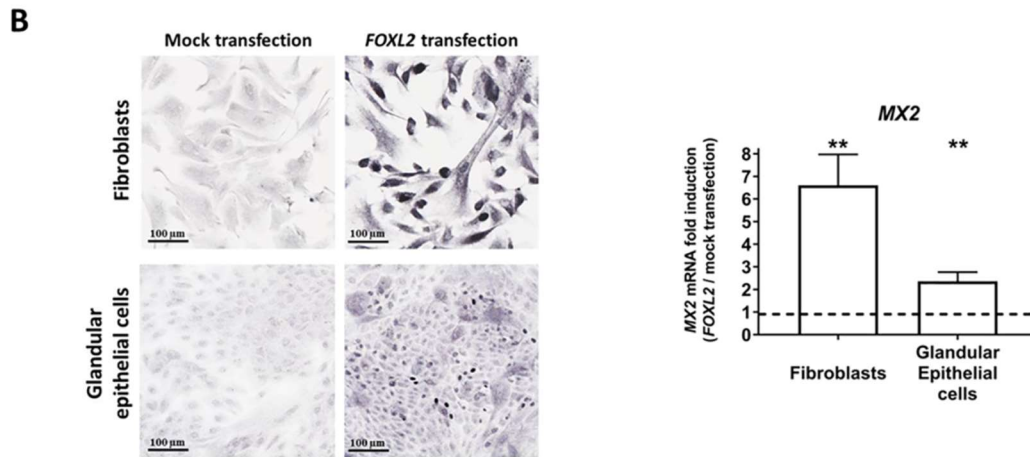
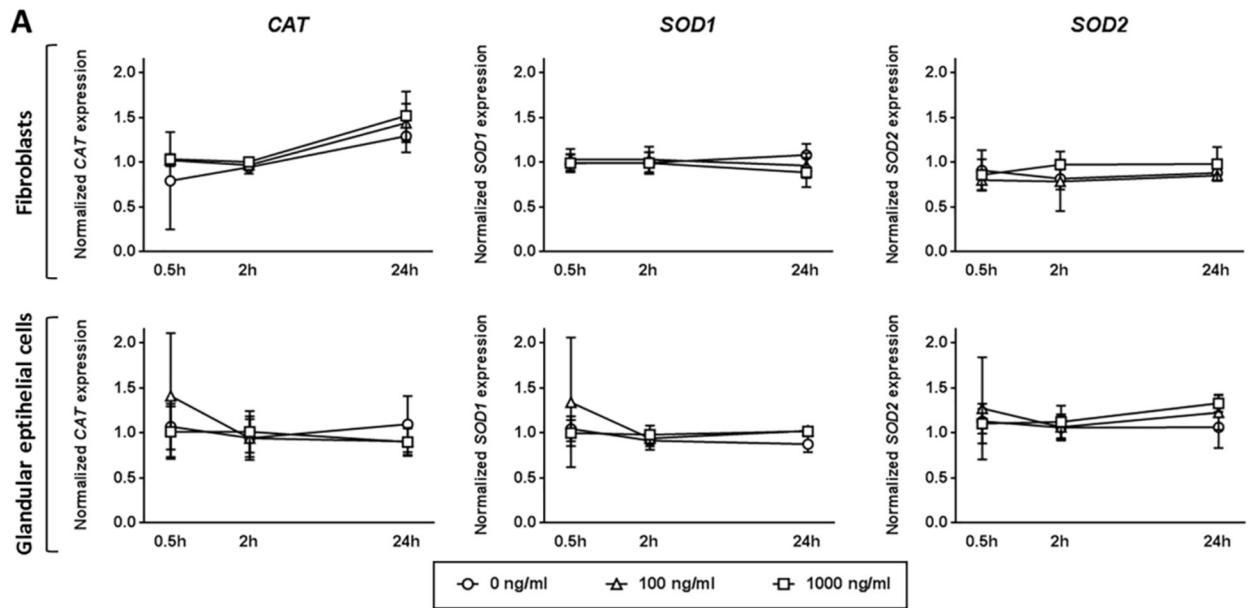
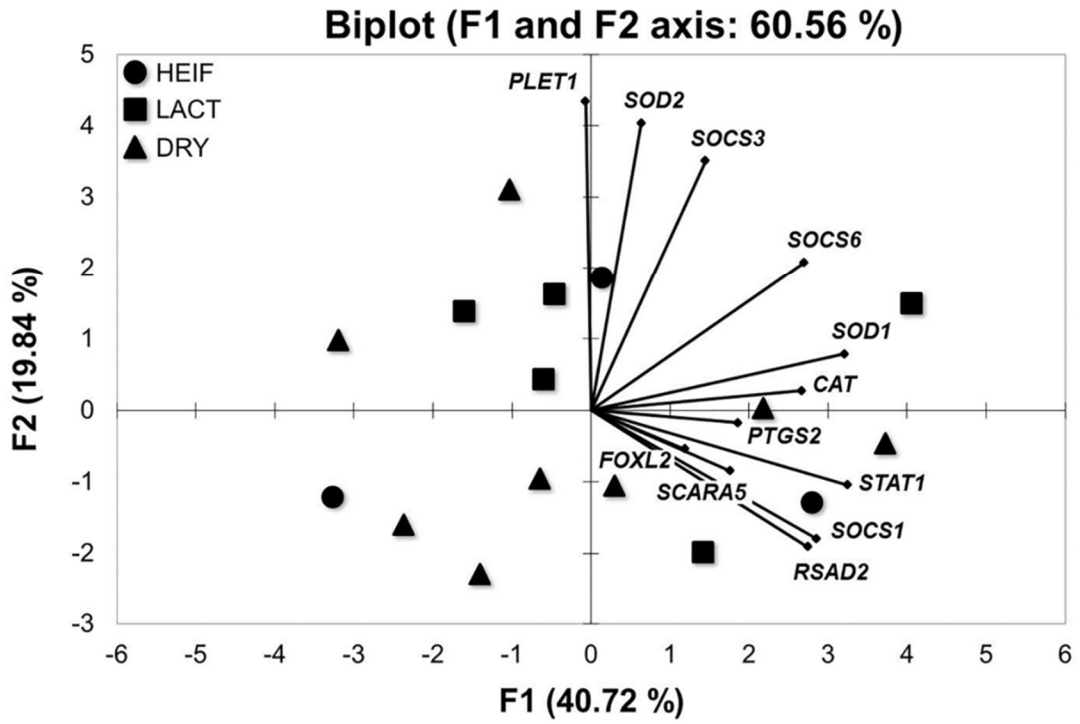
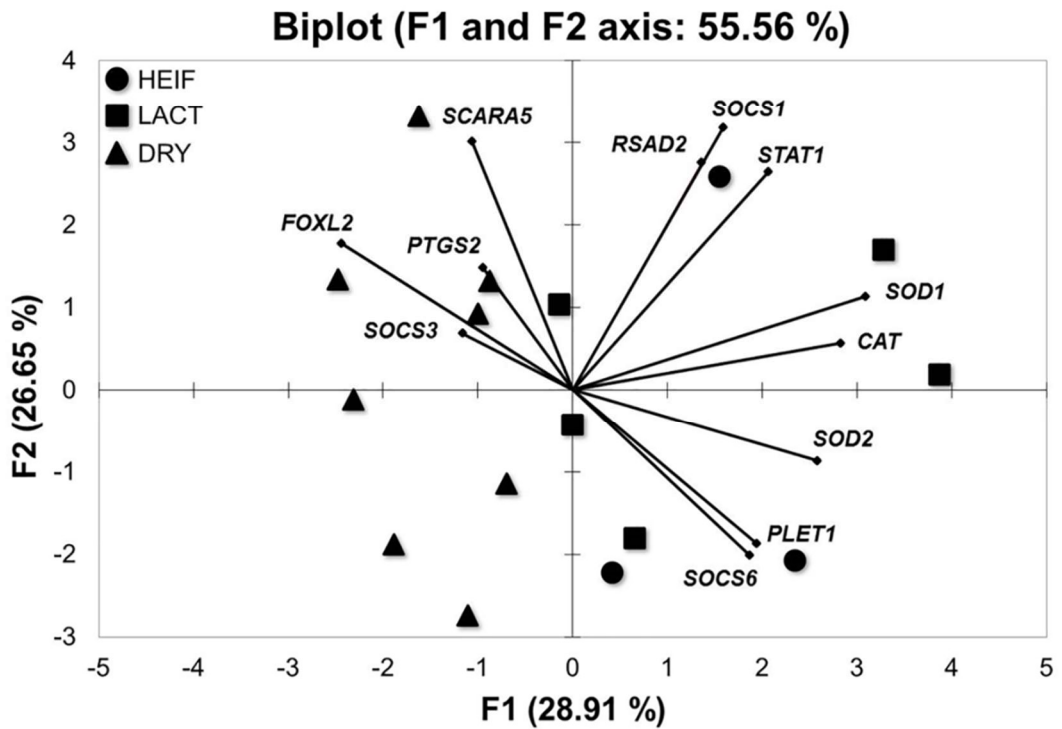


Fig5

A – CAR area



B – ICAR area



Supplemental table 1: Gene symbol, gene description, primer sequences, melting temperature TM, amplicon size (pair of bases) and accession number for all genes used in real-time quantitative PCR

Gene symbol	Gene description	Sequence (5' → 3')	Tm (°C)	Amplicon size (bp)	Accession number
C2ORF29	CNOT11 ; CCR4-NOT transcription complex subunit 11	Forward: CCTTCAAGAGCCCTGT Reverse: GGGTCTCTTCCAACTCTCC	59 58	64	XM_002691150.1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Forward: GCGGATGCCCCATGTTGT Reverse: TCATAAGTCCCTCCACGATGC	63 60	151	NM_001034034.2
RPL19	Ribosomal protein L19	Forward: CCCCAATGAGACCAATGAAATC Reverse: CAGCCCATCTTTGATCAGCTT	57 59	73	NM_001040516.1
SLC30A6	Solute carrier family 30 member 6	Forward: TGATGAGGAAACCTAGCCCTGCC Reverse: TCGGGTGTCTCCAAAAGCGT	57 57	142	NM_001075766.1
SUZ12	Polycomb repressive complex 2 subunit	Forward: CGTTGTGAGAGTTTGGCCCTGT Reverse: ACCACAGTGTGGAGTTGGACT	65 64	140	NM_001205587.1
CAT	Catalase	Forward: TCACTCAGGTCCGACTTTC Reverse: GGATGGGGAGCCATATCA	60 60	162	NM_001035386.2
FOXL2	Forkhead box protein L2	Forward: CCGGCATCTACCAGTACATTATAGC Reverse: GCACCTCGTTGAGGCTGAGGT	61 62	101	NM_001031750.1
MX2	MX dynamin like GTPase 2	Forward: CAGAGACGCTCAGTCGAAGC Reverse: TGATTGGCGAGACGTTTGTCT	63 60	121	NM_173941.2
PLET1	Placenta expressed transcript 1 - C11ORF34	Forward: CACTAGCCTCCCAAAGCCAA Reverse: CAGGATCTGGATGGCTCTCT	62 61	121	NM_001113538.1
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Forward: TCCGCCAACTTATAAIGTGCAC Reverse: GGCAGTCAATCAGGCACAGGA	60 62	101	NM_174445.2
RSAD2	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2	Forward: ACTGGACCTGGCTTTTCTGTGA Reverse: ACGTTGCCCTAGATTACATCCTTATT	62 60	100	NM_001045941.1
SCARA5	Scavenger receptor class A member 5	Forward: CAAGGGTGTGAAGGGAAGC Reverse: GCCACTGGCATCCACTGTTTC	59 62	121	NM_001102499.1
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1	Forward: CTCGTACCTCTACCTCTTTCATGTT Reverse: ACAGCAGAAAATAAAGCCAGAGA	61 59	93	XM_864316.5
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3	Forward: GCCACTCTCCAACATCTCTGT Reverse: TCCAGGACCTCCCGAATGG	60 61	98	NM_174466.2
SOCS6	Suppressor of cytokine signaling 6	Forward: AGAAGTCAAAAATGTCACAGGAA Reverse: CAATGGTTAGCCTTTTGGCAT	60 58	120	XM_015460063.1
SOD1	Superoxide dismutase 1	Forward: CACCATCCACTTCGAGGCAA Reverse: GCACCTGGTACAGCCTTGTGT	60 61	126	NM_174615.2
SOD2	Superoxide dismutase 2	Forward: GGATCCCCCTGCAAGGAACAA Reverse: TGGCCTTCAGATAATCGGGC	60 60	110	NM_201527.2
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1	Forward: GCATAGTCAAGGCCAAATTTGTTACAG Reverse: GCCCAGATACAGGACAGCTTTGCAC	64 66	140	BC151378

4. Conclusions de l'article 1

Le métabolisme maternel est perturbé par la lactation et entraîne des variations de l'expression de gènes endométriaux lors de l'implantation embryonnaire. Notre étude compare pour la première fois les différentes zones de l'endomètre dans un modèle de métabolisme contrasté. Nous avons ainsi mis en évidence que la zone ICAR est la plus affectée par les perturbations du métabolisme maternel. De plus la réponse de l'endomètre à la présence du conceptus n'est pas influencée par la lactation à 19 jpo.

Nous avons montré que les enzymes antioxydantes *CAT*, *SOD1* et *SOD2* sont exprimées et régulées dans l'endomètre bovin au cours du cycle œstral et de la gestation précoce indépendamment de l'IFNT. Lors de l'implantation, l'expression de *SOD2* est notamment augmentée dans la zone ICAR. Dans notre modèle de métabolisme contrasté, l'expression des enzymes antioxydantes ne varie pas entre HEIF et LACT à 19 jpo. En revanche lorsque les femelles sont tarées après le vêlage (DRY), nous observons une diminution de l'expression de *CAT* et *SOD1* dans la zone ICAR ce qui suggère une diminution de la production de ROS et par conséquent du stress oxydatif. La différence de statut oxydatif entre les vaches LACT et DRY peut être à l'origine des troubles de la fertilité.

Enfin nous avons montré une augmentation de l'expression de *FOXL2* dans le tissu ICAR indépendamment de la concentration en P4 circulante. *FOXL2* ne régule pas l'expression des enzymes antioxydantes dans les cellules endométriales bovines contrairement à ce qui a été décrit précédemment dans les cellules KGN (Batista *et al.*, 2007). Identifier les gènes cibles de *FOXL2* dans les cellules endométriales bovines nous permettrait de mettre en évidence les fonctions biologiques associées et ainsi comprendre les rôles de *FOXL2* dans la physiologie de l'endomètre chez les bovins.

PARTIE 3 :
Identification
des gènes cibles de FOXL2
dans les cellules
endométriiales bovines

1. Introduction

La mise en place de la gestation nécessite une communication finement régulée entre un endomètre réceptif et un conceptus compétent au cours de la période pré implantatoire. Le concept de réceptivité endométriale et de la fenêtre d'implantation a été émis chez la femme (Hertig *et al.*, 1956). La démonstration fut faite en 1991 grâce à un modèle de transfert d'embryons produits *in vitro* après don d'ovocytes, chez des patientes à différents stades du cycle menstruel (Navot *et al.*, 1991). Les auteurs ont ainsi montré qu'en dehors de la fenêtre d'implantation de 3 jours l'embryon ne s'implante pas. L'endomètre maternel se prépare à l'implantation du conceptus. La mise en place de cette réceptivité utérine est un processus complexe coordonné par les sécrétions séquentielles d'E2 et de P4. Elle implique une régulation précise des signaux moléculaires. L'E2 induit la prolifération cellulaire et la P4 régule la maturation et l'activité sécrétoire des glandes endométriales. Les variations d'expression des gènes endométriaux au cours du cycle œstral ont été décrites chez plusieurs espèces telles que la femme (Horcajadas *et al.*, 2007), la souris (Tan *et al.*, 2003) ou encore les bovins (Bauersachs *et al.*, 2005; Mitko *et al.*, 2008; Ponsuksili *et al.*, 2012).

L'endomètre est un capteur biologique (« sensor) de la qualité embryonnaire et dans la mesure du possible il s'adapte (« driver ») pour mener la gestation à terme (Mansouri-Attia *et al.*, 2009a). La qualité de l'endomètre est donc décisive pour la réussite de la gestation. Au sein de l'organisme maternel, l'endomètre est soumis aux variations de son environnement comme la nutrition, les infections ou le stress. Nous avons vu précédemment que la lactation perturbe les performances reproductives chez les vaches laitières hautes productrices. Lorsque les vaches sont tarées immédiatement après le vêlage, le taux de gestation est nettement amélioré par rapport à celui des vaches en lactation (Cerri *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2012; Forde *et al.*, 2015). Dans ce contexte notre étude précédente a montré que l'expression de *FOXL2* est augmentée à l'implantation chez les vaches tarées par rapport aux vaches en lactation et aux génisses.

Nous avons vu dans l'introduction que *FOXL2* régule plusieurs centaines de gènes dans l'hypophyse et l'ovaire aussi bien pendant le développement fœtal qu'au cours de la vie adulte (Fig 46). C'est un gène majeur de la différenciation et du maintien de la fonction ovarienne (Cocquet *et al.*, 2002). Il est impliqué de grandes fonctions biologiques telles que la régulation de la sécrétion des gonadotrophines dans l'hypophyse, la réponse au stress, la régulation de l'apoptose, l'inflammation et le métabolisme des stéroïdes dans l'ovaire.

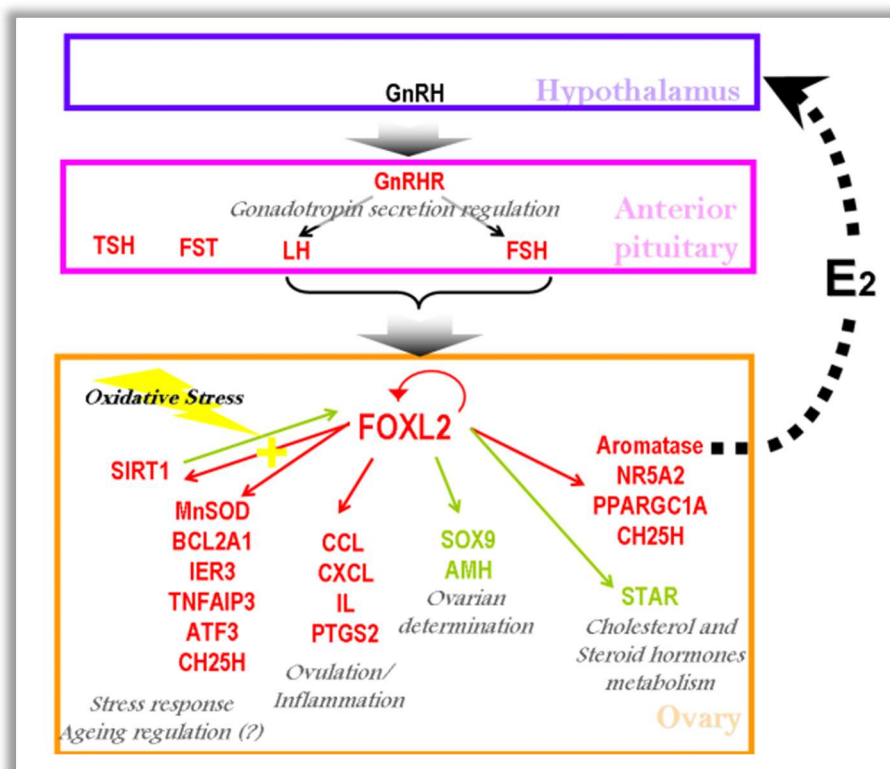


Figure 46 : Gènes cibles de *FOXL2* dans l'axe hypothalo-hypophysaire-gonade. Les gènes en rouge sont stimulés par *FOXL2* alors que les gènes en vert sont inhibés (Benayoun and Veitia, 2011).

Dans l'endomètre bovin, l'expression de *FOXL2* varie au cours du cycle œstral et est régulée par la P4 (Mansouri-Attia *et al.*, 2009b; Eozenou *et al.*, 2012). Il a été montré plus récemment que son expression est augmentée dans l'endomètre de patientes atteintes d'endométriose (Governini *et al.*, 2014). Enfin dans le modèle murin, *FOXL2* est exprimé dans les cellules stromales et le myomètre pendant la maturation post natale de l'utérus (Bellessort *et al.*, 2014). Les souris déplétées du gène *Foxl2* présentent une diminution du stroma de l'endomètre, une hypertrophie et une désorganisation du myomètre.

Actuellement nous n'avons pas d'information sur les fonctions biologiques de FOXL2 dans l'endomètre. L'objectif de cette seconde étude est donc d'identifier les gènes cibles de FOXL2 dans les cellules endométriales par génomique fonctionnelle et ainsi mettre en évidence les rôles biologiques de FOXL2 dans la physiologie endométriales bovines.

2. Modèle expérimental

Pour réaliser cette étude, nous avons sélectionné trois génisses Holstein du troupeau de l'UCEA (INRA) du même âge et de même poids. Les femelles ont été synchronisées à l'aide du dispositif Crestar et prélevées par biopsies à 15 jpo. Des cultures primaires de fibroblastes et de cellules EG ont été dérivées de ces biopsies. La morphologie des cellules a été vérifiée par observation du cytosquelette d'actine (marquage à la phalloïdine). Les cellules ont été transfectées avec le plasmide vide pSG5 (mock) ou le plasmide pSG5-FOXL2 par magnétofection pendant 24h (Annexe 1.h). Pour chaque animal et chaque type cellulaire, la transfection a été réalisée 4 fois par condition. Les ARNm des répliques ont été poolés pour le microarray mais analysés séparément en RT-qPCR.

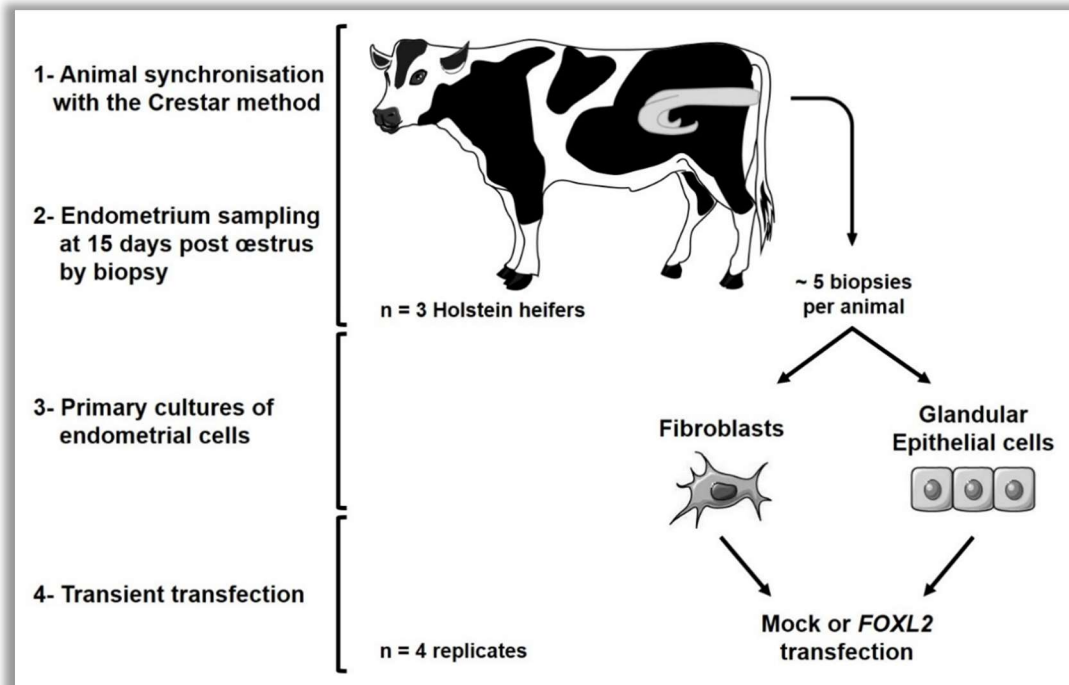


Figure 47 : Protocole expérimental du modèle *in vitro* de surexpression de FOXL2 dans les cultures primaires de cellules endométriales bovines par transfection transitoire.

Les génisses sont synchronisées et prélevées par biopsies le 15^{ème} jour post œstrus. Pour chaque animal des cultures primaires de cellules endométriales sont dérivées. Les fibroblastes et les cellules épithéliales glandulaires sont cultivés séparément et transfectés soit avec le plasmide vide pSG5 soit avec le plasmide pSG5-FOXL2.

Une partie des cellules transfectées ont été fixées en PAF 4% pour la détection de la protéine FOXL2 par immunocytochimie. Certaines cellules EG ont été récupérées par grattage de la boîte de culture et conservées à -80°C jusqu'à l'analyse par western blot. Cette dernière analyse n'a pas été réalisée pour les fibroblastes car la quantité de cellules obtenues à partir des biopsies était limitante. La majorité des cellules transfectées ont été lysées en Trizol et conservées à -80°C pour les analyses transcriptomiques.

Les ARN totaux ont été extraits et purifiés à la DNase sur colonne à l'aide du kit Rneasy mini (Qiagen). Les ARNm ont été quantifiés et leur qualité contrôlée au Bioanalyzer (Agilent ; Plateforme Abridge-GABI, INRA). Les transcriptomes des cellules endométriales transfectées (mock et FOXL2) ont été analysés sur une puce oligoarray bovine non commerciale contenant 23 926 gènes uniques (SurePrint G3 Custom GE 8x60K, Agilent). Les données transcriptomiques ont été traitées dans un premier temps par L. Jouneau, un bioinformaticien de l'unité d'accueil, afin de mettre en évidence les gènes cibles de FOXL2. J'ai ensuite analysé les résultats à l'aide de l'application GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) afin d'identifier les fonctions biologiques régulées par FOXL2. Sur la base de ces deux analyses, j'ai validé l'expression différentielle de gènes cibles appartenant à cinq sets de gènes différents : l'apoptose et la réponse au stress, l'immunité, la réponse aux interférons de type I, la modification de la matrice extracellulaire et la détermination du sexe. De ces groupes de gènes identifiés et validés nous avons mis en évidence des fonctions biologiques régulées par FOXL2 dans les cellules endométriales bovines.

L'expression de certains gènes cibles a été analysée *in vivo* dans les tissus CAR et ICAR dans un modèle de génisses cyclées ou gestantes à 16 et 20 jpo. Les résultats obtenus *in vitro* sont alors comparés aux données *in vivo*.

3. Article 2

***FOXL2* biological functions in bovine endometrial cells**

A. Lesage-Padilla, P. Reinaud, Christophe Richard, Corinne Giraud-Delville, Jean-François Oudin, Luc Jouneau, Caroline Eozenou, Jérôme Lecardonnel, Catherine Archilla, Anaïs Vitorino-Carvalho, Valérie Gelin, Niamh Forde, Pat Lonergan, Véronique Duranthon, Maëlle Pannetier, Gilles Charpigny, Olivier Sandra

Soumission prévue à *Biology of Reproduction*

1 ***FOXL2* biological functions in bovine endometrial cells**

2 Audrey Lesage-Padilla¹, Pierrette Reinaud¹, Christophe Richard¹, Corinne Giraud-Delville¹,
3 Jean-François Oudin¹, Luc Jouneau¹, Caroline Eozenou¹, Jérôme Lecardonnel², Catherine
4 Archilla¹, Anaïs Vitorino-Carvalho¹, Valérie Gelin, Niamh Forde³, Pat Lonergan³, Marco
5 Moroldo², Véronique Duranthon¹, Maëlle Pannetier¹, Gilles Charpigny¹, Olivier Sandra¹

6

7 ¹ INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350 Jouy-en-Josas,
8 France.

9 ² CRB GADIE, INRA, Domaine de Vilvert, 78350, Jouy-en-Josas, France.

10 ³ School of Agriculture and Food Science, University College Dublin, Dublin, Ireland.

11

12

13

14

15

16

17

18 **INTRODUCTION**

19 Female fertility is defined as the ability to be fertilized and to successfully complete the
20 pregnancy. Last decades, we have seen the decline of reproductive performances in high-
21 yielding dairy cattle (Norman *et al.*, 2009; Le Mezec, 2014). The fertilization rate is about 90%
22 by artificial insemination and 70% of pregnancy losses occur during the pre implantatory period
23 (Diskin and Morris, 2008). Implantation is the establishment of cellular and permanent
24 interactions between a receptive endometrium and a competent and synchronised embryo. It is
25 a critical step to ensure the proper course of the gestation (Sandra *et al.*, 2015). Endometrium
26 is a biological sensor of embryo quality and a driver of pregnancy success (Sandra *et al.*, 2011).
27 It could be affected by environmental disturbances such as nutrition, infections or stress through
28 the maternal organism. As the only maternal tissue in direct contact with the offspring,
29 endometrial quality is decisive for implantation and pregnancy outcomes. Disruptions of the
30 foeto maternal environment impact on calf ante natal programming and zootechnical
31 performances in adulthood (Gonzalez-Recio *et al.*, 2012). In this context it is essential to define
32 endometrial quality for the purposes of understanding how endometrial function is disturbed.

33 *FOXL2* encodes a transcription factor highly conserved among vertebrates (Baron *et al.*,
34 2005). It was firstly identified as the gene associated with Blepharophimosis–Ptosis–Epicanthus
35 inversus Syndrome (BPES) in human (Crisponi *et al.*, 2001) and Polledness and InterSexuality
36 (PIS) mutation in goat (Pailhoux *et al.*, 2002). *FOXL2* is a key gene involved in ovarian
37 development and its function in adulthood (Cocquet *et al.*, 2003). Previous studies have shown
38 that *FOXL2* protects granulosa cells from stress and inhibits cell proliferation (Benayoun *et al.*,
39 2011a). *FOXL2* overexpression in KGN cells highlights that *FOXL2* affects inflammatory
40 process, reactive oxygen species (ROS) detoxification and regulates apoptosis (Batista *et al.*,
41 2007). Our team has recently demonstrated that *FOXL2* is differentially expressed between
42 estrous cycle and pregnancy in bovine endometrium (Mansouri-Attia *et al.*, 2009). Actually

43 through estrous cycle, *FOXL2* expression is higher during the follicular phase and early luteal
44 phase and lower during late luteal phase. In presence of the conceptus, progesterone (P4) blood
45 level is maintained and *FOXL2* mRNA level stays low (Eozenou *et al.*, 2012). In mice, *FOXL2*
46 is expressed in stromal and myometrial cells during the post-natal uterine maturation. In KO
47 conditional mice, the stroma decreases and the myometrium is disorganized (Bellessort *et al.*,
48 2014). Finally in women *FOXL2* overexpression is associated with endometriosis (Governini
49 *et al.*, 2014). *FOXL2* presence in endometrium is now clearly stated nevertheless its biological
50 function is unknown up to now. To understand how *FOXL2* affects endometrial physiology, it
51 is necessary to identify its target genes. In the present study, we have developed an *in vitro*
52 model of primary cultures of bovine endometrial cells overexpressing *FOXL2*. These cultures
53 were derived from biopsies collected during late luteal phase when *FOXL2* expression is the
54 lowest. We have developed cultures of fibroblasts (stromal cells) and glandular epithelial (GE)
55 cells in order to determine if *FOXL2* acts differentially in those two main endometrial cell types.
56

57 **MATERIALS AND METHODS**

58 *Ethics*

59 *Primary culture of bovine endometrial cells derived from biopsies*

60 Three Holstein heifers were synchronized using EAZI-BREED™ CIDR® cattle insert (Zoetis,
61 London, UK). Endometrial samples were collected at 15 *dpo* through biopsies (Fig 1). We
62 derived primary cultures of endometrial cells (fibroblast and glandular epithelial or GE cells)
63 from approximately 500 mg of endometrial tissue per animal. Biopsies were minced and
64 dispersed with 500 UI/ml collagenase and 250 UI/ml hyaluronidase (Sigma-Aldrich, St. Louis,
65 Missouri, USA) in Euroflush (IMV, Saint Ouen sur Iton, France) solution with 1% Penicilline
66 and Streptomycine (Gibco-Life Technologies, Carlsbad, California, USA) for 1.5 h at 37°C. The
67 undigested tissue was eliminated with a cell strainer 100 µm (BD Falcon, Dutscher, Issy les

68 Moulineaux, France). The biggest clumps of uterine glands cells were isolated with a cell
69 strainer 40 µm (BD Falcon, Dutsher). GE cells suspension were seeded into dishes (TPP,
70 Trasadingen, Switherland) and incubated at 37°C and 5% CO₂. And lastly, we used a cell
71 strainer 10 µm (Pluriselect life science, Leipzig, Germany) to isolate fibroblast cells. They were
72 seeded in PRIMARIA dishes (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), and then incubated for 2 h
73 in 20% CO₂. At the end of the preculture step, fibroblasts adhered and floating cells were
74 carefully eliminated by washes. DMEM-F12 medium without phenol red (Sigma-Aldrich)
75 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Biosera, Nuaille, France), ITS (Gibco-Life
76 Technologies), penicillin and streptomycin (Sigma-Aldrich), gentamycin (Biosera),
77 amphotericin B (Dutsher), nystatin (Sigma-Aldrich), stabilised glutamine (Glutamax, Gibco-
78 Life Technologies), was used for culturing glandular epithelial cells and fibroblasts at 37°C and
79 5% CO₂. Culture medium was changed every 2 days until the preconfluence stage was reached.
80 Then cells were treated with trypsin (TrypLE Express; Gibco-Life Technologies),
81 cryopreserved in FCS + 10% DMSO (Sigma-Aldrich) and stored at -80°C before treatment.

82 ***FOXL2 overexpression by transient transfection of primary cultures of endometrial cells***

83 After thawing, endometrial cells were cultured for 24h on 12-well plates (TPP). Fibroblasts
84 were transfected with 1.5 µg of pSG5 plasmid (mock) or pSG5-FOXL2 plasmid (vectors kindly
85 provided by M. Pannetier; INRA, Jouy-en-Josas, France; (Pannetier *et al.*, 2005)), using 4 µl
86 Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and 1.6 µl CombiMag transient reagent
87 (Oz Biosciences, Marseille, France) according to the manufacturer's instructions. GE cells were
88 transfected with 3 µg of pSG5 plasmid (mock) or pSG5-FOXL2 plasmid, using 6 µl
89 Lipofectamine (Invitrogen) and 1.6 µl CombiMag transient reagent (Oz Biosciences) according
90 to the manufacturer's instructions. Cells were lysed 24h after using Trizol reagent (Life
91 Technologies, Carlsbad, California, USA). Cells were transfected in quadruplicate for each cell

92 type and each condition. Cell lysates were frozen and stored at -80°C before analysis. *FOXL2*
93 overexpression and protein localization has been shown by immuno histo chemistry (IHC).

94 ***Cell structure validation by immunofluorescence***

95 Endometrial cells were cultured on sterile cover slides placed in 12 mm dishes, fixed in PAF
96 4% (paraformaldehyde) 10 min at room temperature (rt) and wash twice in PBS (Sigma-
97 Aldrich). Slides were washed 10 min at rt in phosphate buffer (0.1M pH7.4) with 0.2% BSA
98 (Sigma-Aldrich) and 0.5% saponine (Sigma-Aldrich) then 10 min at rt in phosphate buffer
99 (0.1M pH7.4) with 0.2% BSA and 0.05% saponine. Incubation of rhodamine-labeled phalloidin
100 (dilution 1:200, Sigma-Aldrich) in phosphate buffer (0.1M pH 7.4, 0.2% BSA, 0.05% saponine)
101 was performed for 1h in dark to visualize microfilamentous F-actin. Cells were incubated 10
102 min in DAPI (dilution 1:2000, Sigma-Aldrich) in phosphate buffer (0.1M pH 7.4, 0.2% BSA).
103 They were washed in phosphate buffer (0.1M pH 7.4, 0.2% BSA) and in Tris buffer (pH 8.6)
104 with 1.5% Glycine before the mounting with Cityfluor medium (Biovalley, Strasbourg,
105 France).Endometrial cells were observed using an inverted ZEISS AxioObserver Z1
106 microscope equipped with an ApoTome slider (MIMA2 platform, INRA, Jouy-en-Josas,
107 France) and analysed with the AxioVision Microscopy Software (Zeiss, Le Pecq, France).

108 ***FOXL2 localization in transfected cells by immuno cytochemistry (ICC)***

109 Fibroblasts and GE cells were cultured on Lab-tech chamber slide system (Sigma-Aldrich, St.
110 Louis, Missouri, USA) and transiently transfected as previously reported. Cells were fixed 24h
111 after transfection 10 min at room temperature in PAF 4% (Sigma-Aldrich) and washed in PBS
112 (Sigma-Aldrich). Slides were incubated in citrate buffer (sodium citrate 0.01M pH 6) 5 min at
113 room temperature and 10 min at 80°C. The endogenous peroxidase activity was quenched by
114 0.01% H₂O₂ (Sigma-Aldrich) treatment for 30 min. Cells were incubated with a rabbit anti-
115 FOXL2 purified antibody (dilution 1:250, (Eozenou *et al.*, 2012)) in phosphate buffer (0.1M
116 pH 7.4 with 2% BSA and 1% Normal Donkey Serum) overnight at 4%. After washes in

117 phosphate buffer (0.1M pH 7.4 with 2% BSA), a goat anti-rabbit biotinylated antibody (dilution
118 1:1000, Ab6720, Abcam, Cambridge, UK) was applied for 1h at room temperature. Cells were
119 washed in phosphate buffer + 2% BSA and incubated for 1h with ABC Vector kit (Vectastain
120 Elite ABC kit, Vector Labs, Peterborough, UK) in Tris buffer (Tris 50 mM, NaCl 0.15M, pH
121 7.5). They were washed and incubated 5 min with Diaminobenzidine-Nickel in Tris buffer. The
122 Lab-tech chambers were removed and slide were mounted with Eukitt medium (Sigma-
123 Aldrich). Images were collected using Nanozoomer Digital Pathology System and analysed
124 using the NDP View software (Nanozoomer Digital Pathology Virtual Slide software,
125 Hamamatsu, Japan).

126 ***Protein extraction and Western blot analyses***

127 Proteins were extracted from frozen endometrial cells and lysed in 1X Laemmli sample buffer
128 (BioRad, Hercules, California, USA). FOXL2 protein level was investigated from GE cells
129 derived from biopsies from two females due to the small amount of biological material
130 available. Western blot immunoassays were processed in SDS–10% polyacrylamide gel and
131 onto a Hybond-P, polyvinylidene difluoride membrane (Trans-blot® Turbo Midi Size PVDF
132 Membrane; BioRad) with Trans-blot® Turbo (BioRad) system. Membranes were incubated
133 overnight with a rabbit anti-FOXL2 purified antibody (dilution 1:500,(Eozenou *et al.*, 2012))
134 in 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, (pH 7.6) 5% (wt/vol) low-fat milk and 0.1% (wt/vol) Tween
135 20. Then they were incubated 1h with a goat anti-rabbit biotinylated antibody (dilution 1:5000,
136 Ab6720, Abcam). Immunoreactive signals were revealed with the Pierce westernblot signal
137 enhancer reagent followed by enhanced chemiluminescence detection (ECL2 western blotting
138 detection kit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). After stripping
139 GAPDH protein was assessed as a loading control using a rabbit polyclonal anti-GAPDH
140 antibody (Sigma-Aldrich) and donkey peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (Interchim,

141 Montluçon, France). The molecular weights of the proteins identified were calculated using the
142 ProSieve HyperPage Meridian (Bioline, London, UK).

143 ***Expression of FOXL2 target genes during estrous cycle and early pregnancy.***

144 Cyclic and pregnant cross bred heifers were synchronized and artificially inseminated as
145 previously described (Forde *et al.*, 2011). The day of estrus was considered Day 0 and heifers
146 were slaughtered at Day 16 (cyclic: n = 5; pregnant: n=4) and at Day 20 (cyclic: n = 6; pregnant:
147 n = 5). Uteri were collected, flushed and when present recovered concepti were observed by
148 microscopy to confirm the stage of development (Degrelle *et al.*, 2005). From pregnant and
149 cyclic animals, endometrial CAR and ICAR areas were dissected from the uterine horns
150 ipsilateral to the corpus luteum (Mansouri-Attia *et al.*, 2009). Tissue samples were snap frozen
151 in liquid nitrogen and stored at -80°C prior to extraction.

152 ***RNA extraction***

153 Total RNA were isolated by homogenization using Trizol reagent (Life Technologies) as
154 published previously (Mansouri-Attia *et al.* 2009). All RNA samples were purified using
155 Qiagen columns integrating a DNase step (RNeasy mini kit; Qiagen, Hilden, Germany).
156 Quality and integrity and purified total RNA were determined using an Agilent 2100
157 Bioanalyzer (@BRIDGE-ICE platform, INRA, Jouy-en-Josas, France). Total RNA were stored
158 at -80°C prior to analysis.

159 ***Microarray analysis***

160 Total RNA quadruplicates were pooled for transcriptomic analysis. So we have 6 samples for
161 fibroblastic cells (FOXL2-transfected n = 3 ; mock-transfected n = 3) and 6 samples for GE
162 cells (FOXL2-transfected n = 3 ; mock-transfected n = 3). Pooled RNA were amplified and
163 marked according to the Agilent protocol (One-color microarray-based gene expression
164 analysis low input quick amp labelling, ref 51902305 ; One color spike mix, ref 51885282).
165 Samples were fragmented and hybridized on the Bovin SurePrint G3Custom Gene Expression

166 60K microarrays (Agilent Technologies, design ID: 075257) by J. Lecardonnel (@BRIDGE
167 platform, INRA, Jouy-en-Josas, France). Statistical analysis was performed using R software
168 (<http://www.r-project.org/>). Signal of probes replicated have been averaged. Data has been log2
169 transformed and normalized by the median. Limma functions were used to perform the
170 differential expression analysis (Ritchie *et al.*, 2015). Raw p values have been adjusted using
171 the Benjamini–Hochberg procedure. For principal component analysis we used FactoMineR R
172 package (Lê *et al.*, 2008).

173 ***Get Set Enrichment Analysis***

174 Microarray data were evaluated at the level of gene sets using the Gene Set Enrichment Analysis
175 software (GSEA, <http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). GSEA was performed with
176 the following parameters: 1,000 gene set permutations, weighted enrichment statistics, gene set
177 size between 15 and 1,000 and signal-to-noise metrics. Gene sets were considered significantly
178 regulated if the false discovery rate (FDR) q-value was under 0.25. The GSEA-derived
179 normalized enrichment score was used for the visualization of pathway regulation. Gene
180 Ontology (C5:bp = biological process ; C5:cc = cellular component ; C5:mf = molecular
181 function) databases were used to identify regulated pathways.

182

183 ***Real time RT-PCR***

184 Purified total RNA samples were used for Real Time-PCR (RT-qPCR). 500 ng of total RNA
185 was reverse transcribed into cDNA with Maxima enzyme (Thermo Fisher Scientific) in a 20
186 µl-volume. RT-qPCR reactions were carried out with Master Mix SYBR Green and Step One
187 Plus system (Applied Biosystem, Foster city, California, USA). Primers (Eurogentec, Liège
188 ,Belgium) were design (Primer express version 3.0 software; Applied Biosystem, Foster city,
189 California, USA) to specially amplified housekeeping (C2ORF29, GAPDH, RPL19, SLC30A6,
190 SUZ12) and target genes (Supp. 1).

191 ***Statistical analysis***

192 Quantification of the amount of target mRNA relative to that of normalizer genes was calculated
193 using Qbase plus software (Biogazelle; Zwijnaarde, Belgium) according to relative standard
194 curve method (Larionov *et al.*, 2005). Normalized PCR data were processed using the Kruskal-
195 Wallis method using the Rcmdr plug-in Coin (COnditional INference procedures in a
196 Permutation Test Framework; Package Rcmdr) associated with pairwise t-test (R[®] application
197 V3.0.1). Principal Component Analysis (PCA) were carried out in Excel using the XLSTAT
198 software (Addinsoft, Paris France).

199

200 **RESULTS**

201 ***FOXL2 overexpression in primary culture of bovine endometrial cells***

202 Endometrial cells were treated with rhodamine-labeled phalloidin to reveal the actin
203 cytoskeleton (Figure 2A). Fibroblasts appeared elongated and striated. GE cells showed a
204 cuboid morphology and actin microfilaments are located at the cell periphery. FOXL2 protein
205 level is low in mock-transfected endometrial cells. The transient transfection led to the
206 overexpression of FOXL2 protein in *FOXL2*-transfected cells. However, FOXL2 is detected in
207 the nuclei of fibroblasts and GE cells from *FOXL2* transfection (Figure 2A). These results were
208 confirmed by western blotting. FOXL2 protein was weakly detectable in mock-transfected GE
209 cells and FOXL2 protein level is dramatically increased by transient transfection (Figure 2B).

210

211 ***Microarray analysis***

212 Normalized microarray data were first analysed in order to give an overall picture of samples
213 distribution. Euclidean clustering analysis clearly separates fibroblasts and GE cells. However
214 mock and *FOXL2*-transfected samples derived from the same primary culture cluster together
215 (Fig 3A). The principal component analysis (PCA) also discriminates the two cell types with

216 the dimension 1 the represent 40.95% of samples variation (Fig 3B). The second dimension
217 separates GE cells under transfection conditions (26.18%) but fibroblastic samples are not
218 discriminated. This results suggests a higher impact of *FOXL2* overexpression on GE cells that
219 on fibroblasts.

220

221 ***FOXL2 target genes in primary culture of endometrial fibroblastic cells***

222 Fibroblasts derived from bovine endometrial biopsies were transfected in quadruplicate for each
223 condition and each animal. *FOXL2*-transfected and mock-transfected pooled samples from 3
224 females were hybridized on the bovine 60K oligonucleotides microarrays. Differential gene
225 expression in *FOXL2*-overexpressing fibroblasts was observed for *FOXD2* (forkhead box D2:
226 4.67 fold), *MXI* (myxovirus “influenza virus” resistance 1, interferon-inducible protein p78:
227 4.96 fold) and *FOXEI* (forkhead box E1, thyroid transcription factor 2, 3.44 fold). *RSAD2*
228 expression is not statistically different (Adjusted P value = 0.0726), however, we note an
229 increasing trend (Supplemental Table S2).

230 Few individual genes meet the threshold for statistical significance so microarray data were
231 evaluated at the level of gene set using Gene Set Enrichment Analysis software (GSEA,
232 (Subramanian *et al.*, 2005)). GSEA maps all detected unfiltered transcripts to analyse thousands
233 of transcripts potentially involved in the regulation of specific pathways. Gene Ontology (GO;
234 C5all) enrichment analysis demonstrated that a total of 17 significantly upregulated gene sets
235 were observed (FDR q-value < 0.25) including 12 terms for biological process (BP) category
236 and 5 terms for molecular function (MF) category (Supplemental Table S3). In the top fifteen
237 of terms for all databases, with a FDR q-value ranking, upregulated gene sets were related to
238 response to IFN (“response to type I IFN”, “negative regulation of type I IFN production”,
239 “regulation of IFN alpha production” and “positive regulation of IFN alpha production), to
240 sexual characteristics (“NAD ADP ribosyltransferase activity”, “sex determination”, “estrogen

241 receptor binding” and “oocyte differentiation”), to apoptosis (“endopeptidase regulator activity
242 involved in apoptotic”, “apoptotic nuclear changes”, “apoptotic DNA fragmentation” and
243 “DNA catabolic process endonucleolytic”) and to immune response (“negative regulation of
244 viral genome replication” and “regulation of viral replication”) (Figure 4).

245 Gene Ontology (GO; C5all) enrichment analysis demonstrated that a total of 15 significantly
246 downregulated gene sets were observed (FDR q-value < 0.25) including 3 terms for biological
247 process (BP) category and 12 terms for molecular function (MF) category (Supplemental Table
248 S3). In the top fifteen of terms for all databases, with a FDR q-value ranking, downregulated
249 gene sets were related to cell proliferation (“glucuronosyl transferase activity”, “cAMP
250 phosphodiesterase activity”, “cyclin binding”, “protein kinase C activity”, “cyclic nucleotide
251 phosphodiesterase activity” and “cAMP binding”), to cell signalling (“regulation of receptor
252 internalization”, “glutamate receptor activity”, “phosphotransduction”, “olfactory receptor
253 activity” and “phosphatidyl inositol 3 kinase activity”), to cytoskeleton (“scaffold protein
254 binding” and “PDZ domain binding”) and to antioxidant pathway (“glutathione peroxidase
255 activity”) (Figure 2).

256

257

258 ***FOXL2 target genes in primary culture of endometrial glandular epithelial cells***

259 GE cells derived from bovine endometrial biopsies were transfected in quadruplicate for each
260 condition and each animal. *FOXL2*-transfected and mock-transfected pooled samples from 3
261 females were hybridized on the bovine 60K oligonucleotides microarrays. Statistical analysis
262 reveals an aberrant behaviour of one mock-transfected sample then we have decided to exclude
263 this animal from the microarray study (NB: all animals were retained for the candidate gene
264 approach by RT-qPCR). By comparing expression profiles between *FOXL2*-transfected and
265 mock-transfected GE cells, 302 genes were differentially expressed. 293 genes were

266 upregulated and 9 were downregulated by FOXL2 (Supplemental Table S4). Among these
267 genes, a differential expression was observed for *TXNIP* (thioredoxin interacting protein, 4.88
268 fold), *CSF2* (colony stimulating factor 2, 2.56 fold), *RSAD2* (radical S-adenosyl methionine
269 domain containing 2, 2.35 fold), *MMP1* (matrix metalloprotease 1, 2.14 fold), *MMP13* (matrix
270 metalloprotease 13, 2.12 fold) and *CCL20* (C-C motif chemokine ligand 20, 2.04 fold).

271 Microarray data were evaluated at the level of gene set using Gene Set Enrichment Analysis
272 software (GSEA, (Subramanian *et al.*, 2005)). Gene Ontology (GO; C5all) enrichment analysis
273 demonstrated that a total of 388 significantly upregulated gene sets were observed (FDR q-
274 value < 0.25) including 231 terms for biological process (BP) category, 128 terms for cellular
275 component (CC) and 29 terms for molecular function (MF) category (Supplemental Table S3).
276 In the top fifteen of terms for all databases, with a FDR q-value ranking, upregulated gene sets
277 were related to cell cycle (“sister chromatid cohesion and segregation”, “kinetochore”, “nuclear
278 chromosome segregation”, “mitotic nuclear division” and “mitotic cell cycle”), to chromatin
279 structure (“chromosome centromeric region” and “condensed chromosome centromeric
280 region”), to protein trafficking (“nuclear localization sequence binding” and “signal sequence
281 binding”) and to protein modification (“ubiquitin like protein conjugating enzyme binding” and
282 “ubiquitin like protein specific protease activity”) (Figure 5).

283 Gene Ontology (GO; C5all) enrichment analysis demonstrated that a total of 48 significantly
284 downregulated gene sets were observed (FDR q-value < 0.25) including 12 terms for cellular
285 component (CC) category and 36 terms for molecular function (MF) category (Supplemental
286 Table S3). In the top fifteen of terms for all databases, with a FDR q-value ranking,
287 downregulated gene sets were related to mRNA maturation (“prespliceosome”, “U2 type
288 prespliceosome” and “U1 SNRNP”), to extracellular matrix (ECM) interaction (“collagen
289 trimer” and “anchored component of membrane”), to protein maturation (“proteasome core
290 complex” and “endoplasmic reticulum lumen”) and to cell signalling (“chlorid channel

291 complex”, “GABA receptor complex”, “photoreceptor inner segment”, “transporter complex”,
292 etc.) (Figure 5).

293

294 ***Impact of FOXL2 on selected biological functions in bovine endometrial cells***

295 In light of these results and data available in the literature, we have chosen to explore the impact
296 of FOXL2 on the expression of target genes related to several biological functions. As
297 previously reported, endometrial cells were transfected in quadruplicates and in this second part
298 of the study each replicate was analysed separately by RT-qPCR. Then statistical analysis
299 compares FOXL2-transfected cells to mock-transfected cells and takes into account technical
300 quadruplicates for each animal.

301

302 ***Impact of FOXL2 on apoptosis and stress response pathways***

303 Previous studies (Batista *et al.*, 2007; Benayoun *et al.*, 2009) and GSEA analysis have shown
304 that apoptosis and stress response are highly affected by FOXL2. The indispensability of
305 endometrium for the pregnancy successful makes it a key organ against environmental
306 disturbances. In apoptotic pathway, we have observed an up regulation of *BCL2* (B-cell
307 CLL/lymphoma 2: 1.49 fold, $P < 0.05$) expression in fibroblasts but there no effect of FOXL2
308 on *BAX* (BCL2-associated X protein) gene expression (Figure 6). In stress response pathway,
309 we have shown an up regulation of *ATF3* (activating transcription factor 3) expression in
310 fibroblasts (1.46 fold, $P < 0.001$) and in GE cells (1.34 fold, $P < 0.05$). Considering *TXNIP*
311 expression, there is a slight increase (1.27 fold, $P < 0.05$) in fibroblasts only (Figure 6).

312

313 ***Impact of FOXL2 on Extra Cellular Matrix (ECM) modifications related genes***

314 The organisation of cells in endometrium and its morphological modifications through estrous
315 cycle are directly related to Extra Cellular Matrix (ECM). We were interested in particular in

316 two members of the metalloprotease family. We have observed an up regulation of *MMP1* gene
317 expression in fibroblasts (4.30 fold, $P < 0.001$) and in GE cells (1.48 fold, $P < 0.001$). Moreover
318 *MMP13* gene expression is undetectable in fibroblasts but is up regulated by FOXL2 in GE
319 cells (3.27 fold, $P < 0.001$) (Figure 6).

320

321 *Impact of FOXL2 on immunity related genes and interferon regulated genes*

322 During pregnancy and in particular peri implantatory period, the endometrial immune response
323 is modulated to allow the allograft of the conceptus on endometrium. In ruminants, extra
324 embryonic tissue secretes interferon (IFN) that impacts maternal tissues and thus prepares
325 endometrium to implantation. We have observed an up regulation of an up regulation of MX1
326 and MX2 (myxovirus influenza virus resistance 2) in fibroblasts (respectively: 4.56 fold, $P <$
327 0.001 and 6.60 fold, $P < 0.01$) and in GE cells (respectively: 1.60 fold, $P < 0.01$ and 2.36 fold,
328 $P < 0.01$). *RSAD2* expression is increase by FOXL2 in fibroblasts and GE cells (respectively:
329 5.06 and 2.70 fold, $P < 0.001$). Finally *IFI44* (interferon-induced protein 44: 2.18 fold, $P <$
330 0.001) expression is up regulated in GE cells only (Figure 6). Considering immunity related but
331 IFN independent genes, we have shown an up regulation of *CCL20* gene expression (1.77 fold,
332 $P < 0.05$) in fibroblasts and an up regulation of *CSF2* gene expression (1.87 fold, $P < 0.01$) and
333 *RGS2* (regulator of G-protein signaling 2; 1.49 fold, $P < 0.05$) in GE cells (Figure 6).

334

335 *Impact of FOXL2 on sexual characteristics related genes*

336 FOXL2 is a key gene of the female identity (Benayoun *et al.*, 2011b). It is especially known to
337 regulate ovarian differentiation and maintain its biological function (Cocquet *et al.*, 2003).
338 Moreover in the present study, GSEA analysis reveals that the “sex determination” pathway is
339 regulated in fibroblastic cells. We have observed an up regulation of *AMH* expression (anti-
340 Mullerian hormone: 2.38 fold, $P < 0.05$) and a down regulation of *DMRT1* expression

341 (doublesex and mab-3 related transcription factor 1: 0.30 fold, $P < 0.05$) in fibroblasts only
342 (Figure 6). There is no regulation detectable of *PGR* (Progesterone receptor), *SOX9* (sex
343 determining region Y-box 9) and *DLX5* (distal-less homeobox 5) expression in bovine
344 endometrial cells.

345

346 **DISCUSSION**

347 In bovine endometrium, *FOXL2* expression is higher during the follicular and early luteal phase
348 compared to late luteal phase and early pregnancy (Eozenou *et al.*, 2012). As a transcription
349 factor, *FOXL2* has been shown to regulate the expression of numerous molecular pathways
350 through its target genes in KGN cells (Batista *et al.*, 2007; Benayoun *et al.*, 2009) and in ovarian
351 context (mice (Uhlenhaut *et al.*, 2009; Bouhali *et al.*, 2011) and goat (Elzaiaat *et al.*, 2014)).
352 *FOXL2* is a key gene of ovarian function. It is involved in ovarian differentiation, ovulation
353 process and cellular stress response. Recently observed in endometrium (cattle (Mansouri-Attia
354 *et al.*, 2009), human (Governini *et al.*, 2014) and mice (Bellessort *et al.*, 2014)), *FOXL2*
355 endometrial function has not yet been widely studied. This study was designed to provide the
356 first insights on *FOXL2* target genes in bovine endometrium using an *in vitro* model of primary
357 cultures of bovine endometrial cells overexpressing *FOXL2*. The analysis of the transcriptome
358 reveals that a few numbers of genes are differentially expressed in fibroblasts. Moreover, fold
359 induction in both fibroblasts and GE cells are low. Under these conditions, the conventional
360 approach becomes inefficient particularly because of arbitrary threshold used. Then single gene
361 analysis may miss important effects on biological pathways when genes act in concert. Then
362 we have chosen to use Gene Set Enrichment Analysis, a powerful analytical method that
363 interprets gene expression data by focussing on gene sets (Subramanian *et al.*, 2005).
364 Considering the microarray analysis, GSEA results and data available in the literature we have
365 selected several biological pathways to study.

366 There is a close interrelationship between immune and reproductive systems. During estrous
367 cycle, ovarian hormones tightly regulate immune cells activity (Mann *et al.*, 1994). In presence
368 of the conceptus, P4 promotes the semi-allograft in the endometrium by modulating the immune
369 response (Bazer *et al.*, 2008). In ruminant the elongating conceptus secretes IFNT, the major
370 signal of pregnancy maternal recognition. This signal maintains a functional corpus luteum with
371 its P4 secretion and improves the uterine receptivity to conceptus implantation (Spencer *et al.*,
372 2007). P4 is able to induce IFN Stimulated Genes (ISG) expression in association with IFNT
373 leading to repression of immune response at implantation (Bazer *et al.*, 2008). The microarray,
374 GSEA and RT-qPCR analyses reveal a significant impact of FOXL2 on ISG. Indeed *MX1*, *MX2*
375 and *RSAD2* expression are stimulated by FOXL2 in both fibroblasts and GE cells while *IFI44*
376 expression is impacted only in GE cells. We know that IFNT induces *MX1* and *MX2* expression
377 and their antiviral action (Mansouri-Attia *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2009). However, it has
378 been recently reported that their expression are maintained until day 130-150 of pregnancy, i.e.
379 late after the conceptus IFNT secretion time frame (Shirozu *et al.*, 2016). This period coincide
380 with the end of foetal immunity development suggesting that MXs endometrial expression
381 protects the foeto-maternal interface from infection until the offspring could defend themselves.
382 *RSAD2* is regulated by P4 and IFNT. It modulates adaptive immunity and prevents uterine
383 infections (Mansouri-Attia *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2011). *IFI44* is regulated by IFNT during
384 early pregnancy in cattle and has an anti-proliferative activity under IFN type I control (Hallen
385 *et al.*, 2007; Forde *et al.*, 2011). We have recently shown that *FOXL2* is not regulated by IFNT
386 (Eozenou *et al.*, 2012), one might therefore wonder whether FOXL2 regulates another IFN type
387 I pathway. Then we looked at IFNA, B, E and T. None of them is significantly regulated by
388 FOXL2 according to microarray analysis. Further investigations such as IFN dosage in culture
389 media are required to elucidate if IFN are implicated in ISG regulation by FOXL2. In any case,

390 FOXL2 enhances ISG expression and participates to the protection of the endometrium from
391 viral and bacterial infections.

392 Throughout estrous cycle, there is a regulation of immune system regardless of IFNT. FOXL2
393 participates to this regulation and we focussed our study on three immunity related genes.
394 *CCL20* expression is upregulated by FOXL2 in fibroblasts. It is a regulator of inflammatory
395 process (Sheldon and Roberts, 2010) and a chemoattractant to macrophages and dendritic cells
396 (Sun *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2009). *RGS2* expression is increased in FOXL2 transfected GE
397 cells. In mice, RGS2 improves lymphocyte proliferation (Oliveira-Dos-Santos *et al.*, 2000) and
398 regulates the uterine blood flow (Jie *et al.*, 2016). In women this gene causes hypertension after
399 preeclampsia (Karppanen *et al.*, 2016). Finally the absence of *FOXL2* expression in goat ovary
400 leads to a decrease of *RGS2* expression (Elzaiaat *et al.*, 2014). So in cow and goat reproductive
401 tracts, FOXL2 upregulates *RGS2* expression. FOXL2 also upregulates *CSF2* expression in GE
402 cells. CSF2 protein is secreted in uterine fluid (Dobbs *et al.*, 2014; Hansen and Dobbs, 2017)
403 and enhances embryo viability and development (Loureiro *et al.*, 2009; Denicol *et al.*, 2014).
404 Scott and colleagues have shown that CSF2 improves leukocytes infiltration to prepare
405 implantation in ewes (Scott *et al.*, 2007). These results reveal that FOXL2 upregulates immune
406 response related genes in a cell-type manner and participates to the establishment of the immune
407 tolerance to prepare embryo arrival.

408 Then ovarian hormonal signalling and immune cells promote apoptosis and tissue remodelling.
409 The bovine endometrium undergoes a slight remodelling with every estrous cycle comparing
410 to women menstrual cycle. However we observe cell proliferation during the follicular phase
411 and apoptosis during the luteal phase (Arai *et al.*, 2014). This balance is monitored with the
412 *BAX* (pro apoptotic signal) and *BCL2* (anti apoptotic signal) expression ratio. *In vivo*, *BCL2*
413 expression is higher in follicular and early luteal phase as *FOXL2* expression, whereas *BAX*
414 expression is higher in late luteal phase. We highlight *in vitro* an upregulation of *BCL2*

415 expression by FOXL2 in fibroblasts while *BAX* is not impacted. In our system, FOXL2 enhance
416 cell proliferation which is consistent with *in vivo* observations. *FOXL2* expression could be
417 impacted by maternal environment and in particular metabolic stress such as lactation (Lesage-
418 Padilla *et al.*, to be submitted). We have considered the impact of FOXL2 on stress related
419 genes. First FOXL2 activates *ATF3* expression in both fibroblasts and GE cells. ATF3 is a
420 transcription factor induced by stress as oxidative stress (Chen *et al.*, 2008) and able to crosstalk
421 with macrophages to boost the remodelling process (Koren *et al.*, 2015). Then FOXL2 activates
422 *TXNIP* expression in fibroblasts. This gene could also be induced by oxidative stress and it
423 regulates proliferation and apoptosis process (Spindel *et al.*, 2012; Forred *et al.*, 2016). FOXL2
424 plays a part in endometrial tissue remodelling mainly in fibroblasts. These results confirm those
425 observed in KGN cells (Batista *et al.*, 2007; Benayoun *et al.*, 2009), in mice (Uhlenhaut *et al.*,
426 2009; Bouhali *et al.*, 2011) and goat ovaries (Elzaiaat *et al.*, 2014).

427 The tissue remodelling could be monitored using the ratio of the expression of metalloproteases
428 (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteases (TIMP), the ECM degradation marker. In
429 bovine ovary, metalloproteases expression is stimulated by PGF2a (Abe *et al.*, 2015) and
430 decreases in infertile dairy cattle (Mutlag *et al.*, 2015). *MMP1* and *MMP13* participate to
431 endometrium remodelling in cow (Wathes *et al.*, 2011) and are upregulated by FOXL2. *MMP1*
432 facilitates cell migration and angiogenesis (Langlois *et al.*, 2007) while *MMP13* enhances pro-
433 inflammatory cytokines expression (Park *et al.*, 2015). These results suggest that FOXL2
434 impacts endometrium remodelling potentially to allow immune cells migration.

435 And finally *FOXL2* is a gene essential for sexual development and the reproductive function in
436 females. Its role in ovary is well known (Georges *et al.*, 2013) but to date there is a lack of
437 information about its implication in endometrial physiology. The uterus belongs to organs
438 derived to Müllerian ducts. AMH exerts a paracrine effect in women endometrium (Wang *et*
439 *al.*, 2009) and regulates cell proliferation and apoptosis (Signorile *et al.*, 2014) through its

440 receptor AMHR. *AMH* expression is increase in fibroblasts overexpressing *FOXL2* but *AMHR*
441 mRNA is undetectable in bovine endometrial cells. So it might be asked whether AMH is a
442 marker of endometrial feature as it is a marker of ovarian feature. On the over hand, in
443 mammalian ovaries *FOXL2* inhibits male genes expression via *SOX9* in mice and via *DMRT1*
444 in goat. It has been shown that *DMRT1* expression increases in goat ovary in absence of *FOXL2*
445 (Elzaiat *et al.*, 2014). In our model, *FOXL2* overexpression leads to a downregulation of
446 *DMRT1* mRNA level in fibroblasts. Interestingly the depletion of the chromosome 9 distal
447 region results in the loss of *DMRT1* and *DMRT2* genes and in the absence of uterus
448 development (Ounap *et al.*, 2004). So *FOXL2* could regulate male genes expression via
449 *DMRT1* in bovine endometrium. It seems to be a critical gene for maintaining the female
450 identity of endometrial tissue.

451 To conclude we have validated that *FOXL2* regulates several biological pathways in bovine
452 endometrial cells. Some of them have been observed as *FOXL2* regulated pathways in KGN
453 cells (Batista *et al.*, 2007; Benayoun *et al.*, 2009) or other mammalian ovaries (Uhlenhaut *et*
454 *al.*, 2009; Bouhali *et al.*, 2011; Elzaiat *et al.*, 2014) (immune and stress response, apoptosis and
455 sex related genes) while others seems to be specific to bovine endometrial cells (response to
456 type I IFN and ECM modification related genes). The target genes validation allows us to refine
457 our hypothesis about *FOXL2* endometrial functions. We have shown that *FOXL2* is 1)
458 implicated in the bacterian and viral protection of foeto maternal interface, 2) the establishment
459 of the immuno tolerance essential for the conceptus implantation, 3) the tissue remodelling to
460 permit the immune cells migration and 4) the setting up of the female identity of the uterus. We
461 have highlighted the first insights on the control of endometrial genes by *FOXL2*. This
462 regulation appears differential between fibroblasts and GE cells in cattle, whereas *FOXL2* is
463 not expressed in mice endometrial GE cells. However the uterine *FOXL2* KO leads to a decrease
464 of stroma and perturbations of its organization (Bellessort *et al.*, 2014). Furthermore if we look

465 closely at FOXL2 target genes in other models, results are comparable with those found in
466 sheep endometrium and goat ovary but not always with rodent and human endometrium or
467 ovary. Thus *FOXL2* biological role in ruminants appears to be different than in other mammals.
468 Such a variation may be due to cofactors encountered in different systems. Indeed sexual
469 reproduction is a highly conserved process in evolution. Vertebrates exhibit diverse sex
470 determination system depending on species (Yano *et al.*, 2012). During development and
471 adulthood, *FOXL2* expression is restricted to three main tissues: pituitary gland (Ellsworth *et*
472 *al.*, 2006), ovary (Cocquet *et al.*, 2003) and endometrium (Eozenou *et al.*, 2012). From an
473 evolutionary point of view, pituitary gland and ovary are reproductive organs existing in all
474 vertebrates whereas the uterus is found only in mammals. It is therefore worth investigating
475 how *FOXL2* gains new functions when it is expressed in a new organ. In this respect *FOXL2*
476 has transversal functions through the female reproductive system and appears to be a master
477 sex-determining gene (Pan *et al.*, 2016).

478

479

480 **ACKNOWLEDGMENTS**

481 We are grateful to the staff of INRA experimental unit (UE1298, Bressonvilliers, France) for
482 animal management. We thank Pierre Adenot and the MIMA2 facility (INRA, Jouy-en-Josas,
483 France) for access to the Apotome microscopy and the region Ile-de-France for funding this
484 system. We are very grateful Laurent Galio (INRA, Jouy-en-Josas, France) for continuous
485 support and the fluorescence image acquisition. We also thank Claudia Bevilacqua and Nicolas
486 Crapart for their welcome and the platform ICE for access to the bioanalyzer (INRA, Jouy-en-
487 Josas, France). And last, we thank Christian Ouali and the NBO unit for access to the
488 Nanozoomer (UR1197, INRA, Jouy-en-Josas, France).

489

491 REFERENCES

- 492 **Abe H, Sakumoto R and Okuda K** (2015) Expression of matrix metalloproteinases in
493 bovine luteal cells induced by prostaglandin F2 α , interferon γ and tumor necrosis factor
494 α . *The Journal of Reproduction and Development* **61** 277–286.
- 495 **Arai M, Yoshioka S, Nishimura R and Okuda K** (2014) FAS/FASL-mediated cell death in
496 the bovine endometrium. *Animal Reproduction Science* **151** 97–104.
- 497 **Baron D, Batista F, Chaffaux S, Cocquet J, Cotinot C, Crihiu E, De Baere E, Guiguen Y,**
498 **Jaubert F, Pailhoux E et al.** (2005) Foxl2 gene and the development of the ovary: a
499 story about goat, mouse, fish and woman. *Reproduction, Nutrition, Development* **45**
500 377–382.
- 501 **Batista F, Vaiman D, Dausset J, Fellous M and Veitia R a** (2007) Potential targets of
502 FOXL2, a transcription factor involved in craniofacial and follicular development,
503 identified by transcriptomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*
504 *United States of America* **104** 3330–3335.
- 505 **Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Spencer TE and Wu G** (2008) Interferons and
506 progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel
507 cell signaling pathways. *Reproductive Biology* **8** 179–211.
- 508 **Bellessort B, Bachelot A, Heude É, Alfama G, Fontaine A, Le Cardinal M, Treier M and**
509 **Levi G** (2014) Role of Foxl2 in uterine maturation and function. *Human Molecular*
510 *Genetics* **24** 3092–3103.
- 511 **Benayoun BA, Batista F, Auer J, Dipietromaria A, L'Hôte D, De Baere E and Veitia RA**
512 (2009) Positive and negative feedback regulates the transcription factor FOXL2 in
513 response to cell stress: evidence for a regulatory imbalance induced by disease-causing
514 mutations. *Human Molecular Genetics* **18** 632–644.
- 515 **Benayoun BA, Georges AB, L'ap;Hôtel D, Andersson N, Dipietromaria A,**
516 **Todeschini A-LL, Caburet S, Bazin C, Anttonen M, Veitia RA et al.** (2011a)
517 Transcription factor FOXL2 protects granulosa cells from stress and delays cell cycle:
518 role of its regulation by the SIRT1 deacetylase. *Human Molecular Genetics* **20** 1673–
519 1686.
- 520 **Benayoun BA, Caburet S and Veitia RA** (2011b) Forkhead transcription factors: Key
521 players in health and disease. *Trends in Genetics* **27** 224–232.
- 522 **Bouhali K, Dipietromaria A, Fontaine A, Caburet S, Barbieri O, Bellessort B, Fellous M,**
523 **Veitia RA and Levi G** (2011) Allelic reduction of Dlx5 and Dlx6 results in early
524 follicular depletion: A new mouse model of primary ovarian insufficiency. *Human*
525 *Molecular Genetics* **20** 2642–2650.
- 526 **Butler WR** (2003) Energy balance relationships with follicular development, ovulation and
527 fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science* **83** 211–218.
- 528 **Chen S-C, Liu Y-C, Shyu K-G and Wang DL** (2008) Acute hypoxia to endothelial cells
529 induces activating transcription factor 3 (ATF3) expression that is mediated via nitric
530 oxide. *Atherosclerosis* **201** 281–288.
- 531 **Chen L, Belton RJ and Nowak RA** (2009) Basigin-mediated gene expression changes in
532 mouse uterine stromal cells during implantation. *Endocrinology* **150** 966–976.
- 533 **Cocquet J, De Baere E, Gareil M, Pannetier M, Xia X, Fellous M and Veitia RA** (2003)
534 Structure, evolution and expression of the FOXL2 transcription unit. *Cytogenetic and*

- 535 *Genome Research* **101** 206–211.
- 536 **Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L,**
 537 **Nagaraja R, Porcu S et al.** (2001) The putative forkhead transcription factor FOXL2 is
 538 mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nature Genetics* **27**
 539 159–166.
- 540 **Degrelle SA, Champion E, Cabau C, Piumi F, Reinaud P, Richard C, Renard J-P and**
 541 **Hue I** (2005) Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development
 542 in bovine blastocysts. *Developmental Biology* **288** 448–460.
- 543 **Denicol AC, Block J, Kelley DE, Pohler KG, Dobbs KB, Mortensen CJ, Ortega MS and**
 544 **Hansen PJ** (2014) The WNT signaling antagonist Dickkopf-1 directs lineage
 545 commitment and promotes survival of the preimplantation embryo. *FASEB Journal :
 546 Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*
 547 **28** 3975–3986.
- 548 **Diskin MG and Morris DG** (2008) Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other
 549 Ruminants. *Reproduction in Domestic Animals* **43** 260–267.
- 550 **Dobbs KB, Gagne D, Fournier E, Dufort I, Robert C, Block J, Sirard M-A, Bonilla L,**
 551 **Ealy AD, Loureiro B et al.** (2014) Sexual Dimorphism in Developmental Programming
 552 of the Bovine Preimplantation Embryo Caused by Colony-Stimulating Factor 2. *Biology*
 553 *of Reproduction* **91** 80–80.
- 554 **Ellsworth BS, Egashira N, Haller JL, Butts DL, Cocquet J, Clay CM, Osamura RY and**
 555 **Camper SA** (2006) FOXL2 in the pituitary: molecular, genetic, and developmental
 556 analysis. *Mol Endocrinol* **20** 2796–2805.
- 557 **Elzaïat M, Jouneau L, Thépot D, Klopp C, Allais-Bonnet A, Cabau C, André M,**
 558 **Chaffaux S, Crihiu E-P, Pailhoux E et al.** (2014) High-Throughput Sequencing
 559 Analyses of XX Genital Ridges Lacking FOXL2 Reveal DMRT1 Up-Regulation Before
 560 SOX9 Expression During the Sex-Reversal Process in Goats 1. *Biology of Reproduction*
 561 **91153** 1–14.
- 562 **Eozenou C, Carvalho A V., Forde N, Giraud-Delville C, Gall L, Lonergan P, Auguste A,**
 563 **Charpigny G, Richard C, Pannetier M et al.** (2012) FOXL2 Is Regulated During the
 564 Bovine Estrous Cycle and Its Expression in the Endometrium Is Independent of
 565 Conceptus-Derived Interferon Tau. *Biology of Reproduction* **87** 32–32.
- 566 **Forde N, Carter F, Spencer TE, Bazer FW, Sandra O, Mansouri-Attia N, Okumu LA,**
 567 **McGettigan PA, Mehta JP, McBride R et al.** (2011) Conceptus-Induced Changes in
 568 the Endometrial Transcriptome: How Soon Does the Cow Know She Is Pregnant? 1.
 569 *Biology of Reproduction* **85** 144–156.
- 570 **Forred BJ, Neuharth S, Kim DI, Amolins MW, Motamedchaboki K, Roux KJ and**
 571 **Vitiello PF** (2016) Identification of Redox and Glucose-Dependent Txnip Protein
 572 Interactions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016** 5829063.
- 573 **Georges A, Auguste A, Bessière L, Vanet A, Todeschini AL and Veitia RA** (2013)
 574 FOXL2: A central transcription factor of the ovary. *Journal of Molecular Endocrinology*
 575 **52** 1–37.
- 576 **Gonzalez-Recio O, Ugarte E and Bach A** (2012) Trans-generational effect of maternal
 577 lactation during pregnancy: a Holstein cow model. *PloS One* **7** e51816.
- 578 **Governini L, Carrarelli P, Rocha ALL, Leo V De, Luddi A, Arcuri F, Piomboni P,**
 579 **Chapron C, Bilezikjian LM and Petraglia F** (2014) FOXL2 in human endometrium:

- 580 hyperexpressed in endometriosis. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)* **21**
581 1249–1255.
- 582 **Hallen LC, Burki Y, Ebeling M, Broger C, Siegrist F, Oroszlan-Szovik K, Bohrmann B,**
583 **Certa U and Foser S** (2007) Antiproliferative activity of the human IFN- α -inducible
584 protein IFI44. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the*
585 *International Society for Interferon and Cytokine Research* **27** 675–680.
- 586 **Hansen PJ and Dobbs KB** (2017) Programming of Embryonic Development. **363** 237–247.
- 587 **Jie L, Owens EA, Plante LA, Fang Z, Rensing DT, Moeller KD and Osei-Owusu P**
588 (2016) RGS2 squelches vascular G_{i/o} and G_q signaling to modulate myogenic tone and
589 promote uterine blood flow. *Physiological Reports* **4** e12692.
- 590 **Karppanen T, Kaartokallio T, Klemetti MM, Heinonen S, Kajantie E, Kere J, Kivinen**
591 **K, Pouta A, Staff AC and Laivuori H** (2016) An RGS2 3'UTR polymorphism is
592 associated with preeclampsia in overweight women. *BMC Genetics* **17** 121.
- 593 **Koren L, Alishekevitz D, Elhanani O, Nevelsky A, Hai T, Kehat I, Shaked Y and**
594 **Aronheim A** (2015) ATF3-dependent cross-talk between cardiomyocytes and
595 macrophages promotes cardiac maladaptive remodeling. *International Journal of*
596 *Cardiology* **198** 232–240.
- 597 **Langlois S, Nyalendo C, Di Tomasso G, Labrecque L, Roghi C, Murphy G, Gingras D**
598 **and Beliveau R** (2007) Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase Stimulates Cell
599 Migration through Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation. *Molecular*
600 *Cancer Research* **5** 569–583.
- 601 **Larionov A, Krause A and Miller W** (2005) A standard curve based method for relative real
602 time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* **6** 62.
- 603 **Lê S, Josse J and Mazet F** (2008) Package ‘FactoMineR’. *Journal of Statistical Software*
604 **25** 1–18.
- 605 **Loureiro B, Bonilla L, Block J, Fear JM, Bonilla AQS and Hansen PJ** (2009) Colony-
606 stimulating factor 2 (CSF-2) improves development and posttransfer survival of bovine
607 embryos produced in vitro. *Endocrinology* **150** 5046–5054.
- 608 **Mann DR, Ansari AA, Akinbami MA, Wallen K, Gould KG and McClure HM** (1994)
609 Neonatal treatment with luteinizing hormone-releasing hormone analogs alters peripheral
610 lymphocyte subsets and cellular and humorally mediated immune responses in juvenile
611 and adult male monkeys. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **78**
612 292–298.
- 613 **Mansouri-Attia N, Aubert J, Reinaud P, Giraud-Delville C, Taghouti G, Galio L, Everts**
614 **RE, Degrelle S, Richard C, Hue I et al.** (2009) Gene expression profiles of bovine
615 caruncular and intercaruncular endometrium at implantation. *Physiological Genomics* **39**
616 14–27.
- 617 **Le Mezec P** (2014) Fertilité des principales races laitières Bilan 1999-2012. 1: 42.
- 618 **Mutlag AM, Wang X, Yang Z, Meng J, Wang X, Zhang J, Qin Z, Wang G and Li J**
619 (2015) Study on matrix metalloproteinase 1 and 2 gene expression and NO in dairy cows
620 with ovarian cysts. *Animal Reproduction Science* **152** 1–7.
- 621 **Norman HD, Wright JR, Hubbard SM, Miller RH and Hutchison JL** (2009)
622 Reproductive status of Holstein and Jersey cows in the United States. *Journal of Dairy*
623 *Science* **92** 3517–3528.

- 624 **Oliveira-Dos-Santos AJ, Matsumoto G, Snow BE, Bai D, Houston FP, Whishaw IQ,**
625 **Mariathasan S, Sasaki T, Wakeham A, Ohashi PS *et al.*** (2000) Regulation of T cell
626 activation, anxiety, and male aggression by RGS2. *Proceedings of the National Academy*
627 *of Sciences of the United States of America* **97** 12272–12277.
- 628 **Ounap K, Uiibo O, Zordania R, Kiho L, Ilus T, Oiglane-Shlik E and Bartsch O** (2004)
629 Three patients with 9p deletions including DMRT1 and DMRT2: a girl with XY
630 complement, bilateral ovotestes, and extreme growth retardation, and two XX females
631 with normal pubertal development. *American Journal of Medical Genetics. Part A* **130A**
632 415–423.
- 633 **Pailhoux E, Vigier B, Vaiman D, Servel N, Chaffaux S, Cribiu EP and Cotinot C** (2002)
634 Ontogenesis of female-to-male sex-reversal in XX polled goats. *Developmental*
635 *Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists* **224** 39–
636 50.
- 637 **Pan Q, Anderson J, Bertho S, Herpin A, Wilson C, Postlethwait JH, Scharl M and**
638 **Guiguen Y** (2016) Vertebrate sex-determining genes play musical chairs. *Comptes*
639 *Rendus Biologies* **339** 258–262.
- 640 **Pannetier M, Renault L, Jolivet G, Cotinot C and Pailhoux E** (2005) Ovarian-specific
641 expression of a new gene regulated by the goat PIS region and transcribed by a FOXL2
642 bidirectional promoter. *Genomics* **85** 715–726.
- 643 **Park JW, Shin IS, Ha UH, Oh SR, Kim JH and Ahn KS** (2015) Pathophysiological
644 changes induced by *Pseudomonas aeruginosa* infection are involved in MMP-12 and
645 MMP-13 upregulation in human carcinoma epithelial cells and a pneumonia mouse
646 model. *Infection and Immunity* **83** 4791–4799.
- 647 **Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W and Smyth GK** (2015) limma
648 powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies.
649 *Nucleic Acids Research* **43** e47.
- 650 **Sandra O, Mansouri-Attia N and Lea RG** (2011) Novel aspects of endometrial function: A
651 biological sensor of embryo quality and driver of pregnancy success. *Reproduction,*
652 *Fertility and Development* **24** 68–79.
- 653 **Sandra O, Constant F, Vitorino Carvalho A, Eoz??nou C, Valour D, Mauffr?? V, Hue I**
654 **and Charpigny G** (2015) Maternal organism and embryo biosensing: Insights from
655 ruminants. *Journal of Reproductive Immunology* **108** 105–113.
- 656 **Scott JL, Ketheesan N and Summers PM** (2007) Granulocyte-macrophage colony
657 stimulating factor and interleukin-8 in the reproductive tract of ewes following oestrus
658 and mating. *Reproduction, Fertility, and Development* **19** 585–593.
- 659 **Sheldon IM and Roberts MH** (2010) Toll-like receptor 4 mediates the response of epithelial
660 and stromal cells to lipopolysaccharide in the endometrium. *PLoS One* **5** e12906.
- 661 **Shirozu T, Sasaki K, Kawahara M, Yanagawa Y, Nagano M, Yamauchi N and**
662 **Takahashi M** (2016) Expression dynamics of bovine MX genes in the endometrium and
663 placenta during early to mid pregnancy. *The Journal of Reproduction and Development*
664 **62** 29–35.
- 665 **Signorile PG, Petraglia F and Baldi A** (2014) Anti-mullerian hormone is expressed by
666 endometriosis tissues and induces cell cycle arrest and apoptosis in endometriosis cells.
667 *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **33** 46.
- 668 **Song G, Fleming JAGW, Kim J, Spencer TE and Bazer FW** (2011) Pregnancy and

669 interferon tau regulate N-myc interactor in the ovine uterus. *Domestic Animal*
670 *Endocrinology* **40** 87–97.

671 **Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC and Palmarini M** (2007) Pregnancy
672 recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: Roles of progesterone,
673 interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction, Fertility and Development* **19**
674 65–78.

675 **Spindel ON, Yan C and Berk BC** (2012) Thioredoxin-interacting protein mediates nuclear-
676 to-plasma membrane communication: role in vascular endothelial growth factor 2
677 signaling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **32** 1264–1270.

678 **Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA,**
679 **Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES et al.** (2005) Gene set enrichment
680 analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles.
681 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**
682 15545–15550.

683 **Sun B, Nasu K, Fukuda J, Mine S, Nishida M and Miyakawa I** (2002) Expression of
684 macrophage inflammatory protein-3alpha in an endometrial epithelial cell line, HHUA,
685 and cultured human endometrial stromal cells. *Molecular Human Reproduction* **8** 930–
686 933.

687 **Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, Treier AC,**
688 **Klugmann C, Klasen C, Holter NI et al.** (2009) Somatic Sex Reprogramming of Adult
689 Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation. *Cell* **139** 1130–1142.

690 **Wang J, Dicken C, Lustbader JW and Tortoriello D V.** (2009) Evidence for a Müllerian-
691 inhibiting substance autocrine/paracrine system in adult human endometrium. *Fertility*
692 *and Sterility* **91** 1195–1203.

693 **Wathes DC, Cheng Z, Fenwick MA, Fitzpatrick R and Patton J** (2011) Influence of
694 energy balance on the somatotrophic axis and matrix metalloproteinase expression in the
695 endometrium of the postpartum dairy cow. *Reproduction* **141** 269–281.

696 **Yamada K, Nakatsu Y, Onogi A, Ueda J and Watanabe T** (2009) Specific intracellular
697 localization and antiviral property of genetic and splicing variants in bovine Mx1. *Viral*
698 *Immunology* **22** 389–395.

699 **Yano A, Guyomard R, Nicol B, Jouanno E, Quillet E, Klopp C, Cabau C, Bouchez O,**
700 **Fostier A and Guiguen Y** (2012) An immune-related gene evolved into the master sex-
701 determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology* **22** 1423–
702 1428.

703

704

705

706

Figure 1: Experimental design. Three Holstein heifers were synchronized with the Crestar method. The endometrium is taken by biopsy at 15 days post oestrus. Primary culture of fibroblasts and glandular epithelial cells were derived and transiently transfected with the mock (pSG5) or the FOXL2 plasmid.

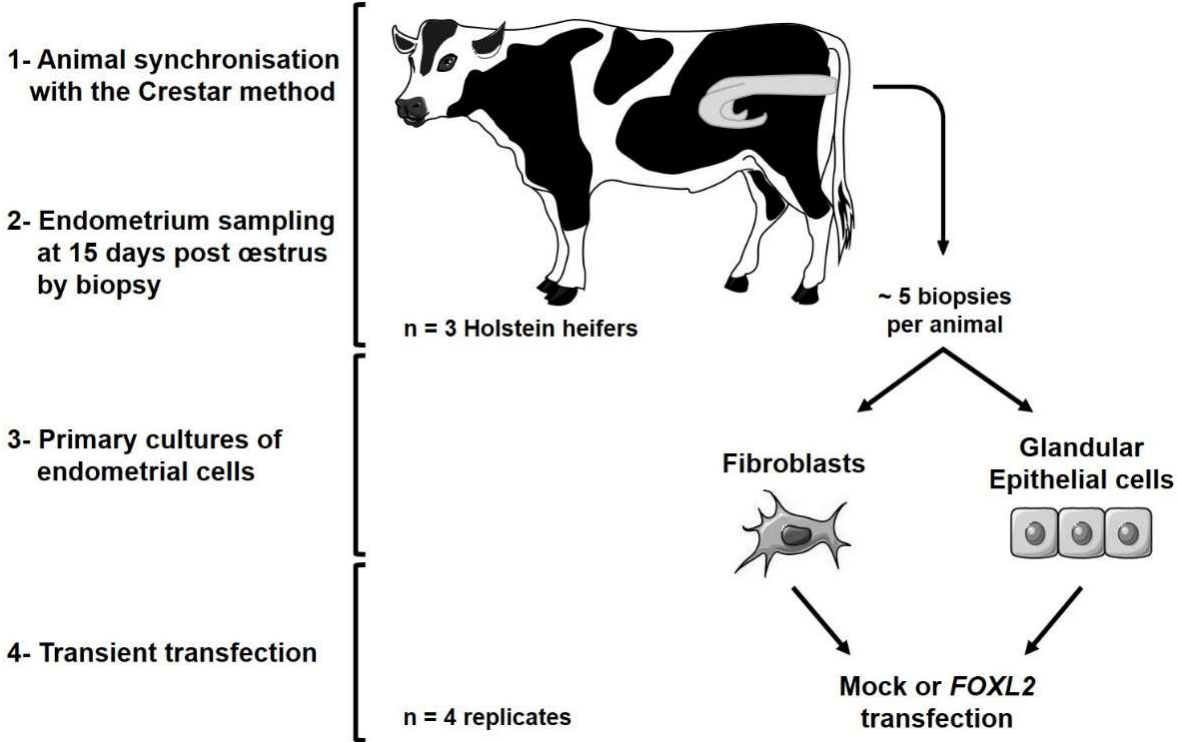


Figure 2: *FOXL2* overexpression in primary culture of bovine endometrial cells. A- Visualization of microfilamentous F-actin with rhodamine labelled phalloidin (red) and nuclei marked with Dapi (blue) to compare cell structures. Sub-cellular localization of *FOXL2* protein in mock (pSG5) or *FOXL2* transfected cells by immune cytochemistry; B- Immunodetection of *FOXL2* and GAPDH protein in glandular epithelial cells transfected with the mock plasmid or *FOXL2* plasmid. *FOXL2* is detected at 50 kDa and GAPDH at 37kDa.

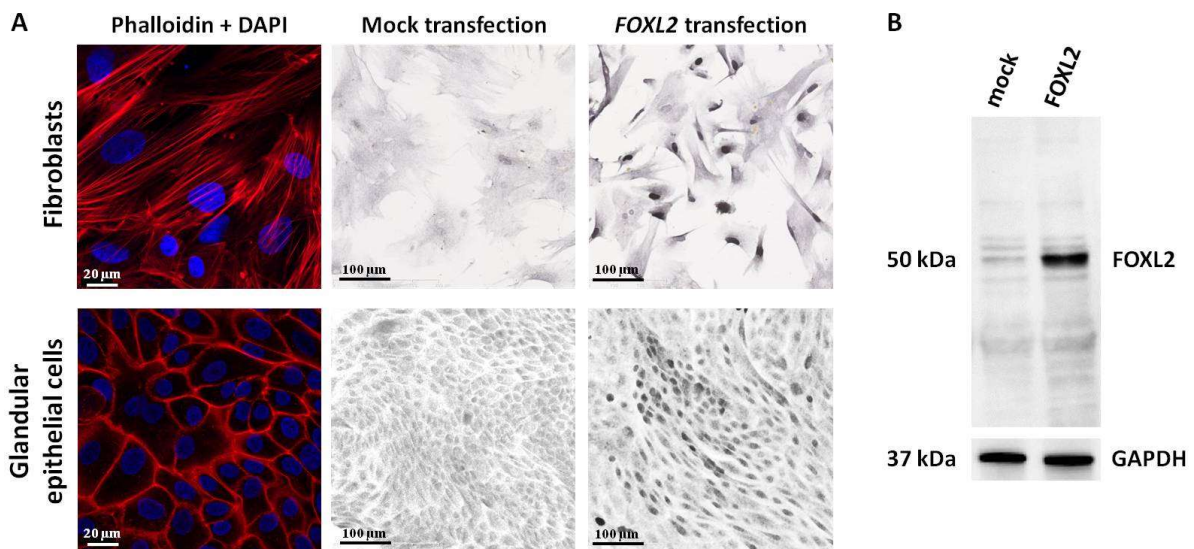


Figure 3: Comparison of fibroblasts and glandular epithelial (GE) cells microarray data. A- The - 152 - uclidean clustering separates fibroblasts from GE cells but not mock transfected from *FOXL2* transfected cells; B- Principal Component Analysis (PCA) segregates GE cells according to the plasmid transfected but not fibroblasts.

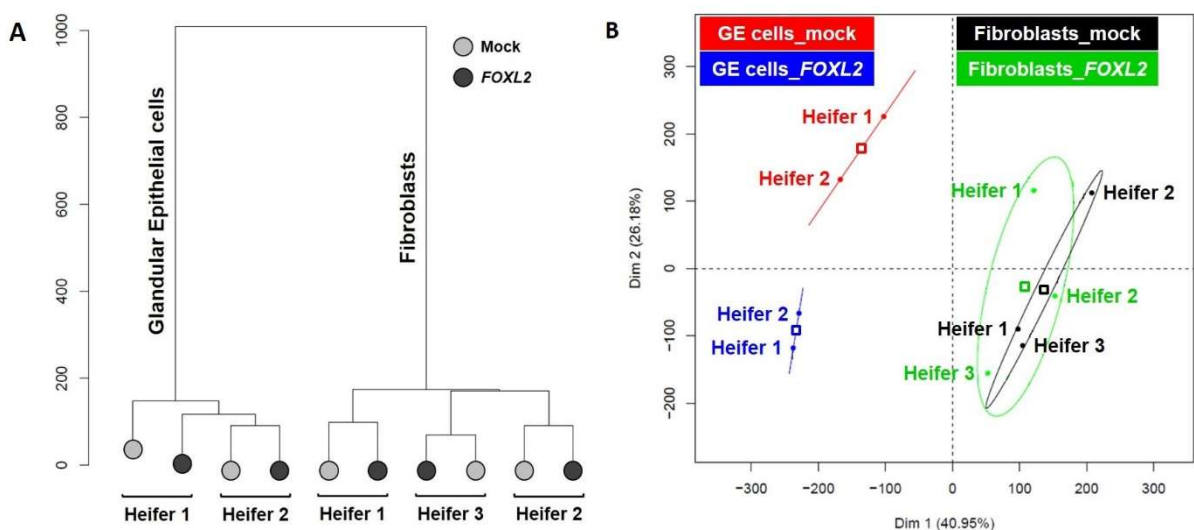


Figure 4: Gene Set Enrichment Analysis in Fibroblasts (C5all – GO). Bar plot depicting the normalized enrichment score of the top 15 most negatively and positively enriched gene sets. The abscissa axis represents the Normalized Enrichment Score of the gene set. They have been sorted in decreasing order of FDR value.

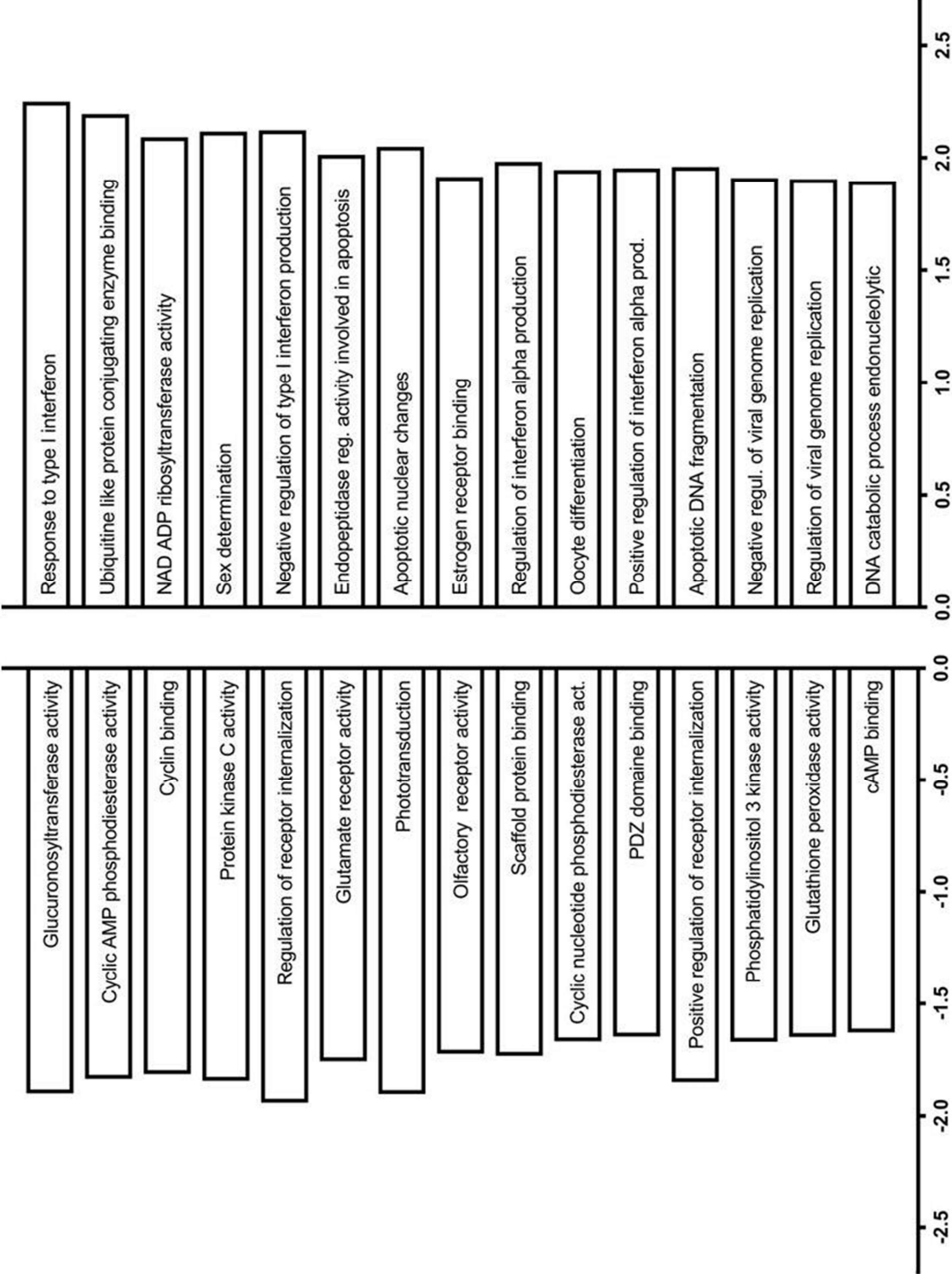


Figure 5: Gene Set Enrichment Analysis in Glandular Epithelial cells (C5all - G0).

Bar plot depicting the normalized enrichment score of the top 15 most negatively and positively enriched gene sets. The abscissa axis represents the Normalized Enrichment Score of the gene set. They have been sorted in decreasing order of FDR value.

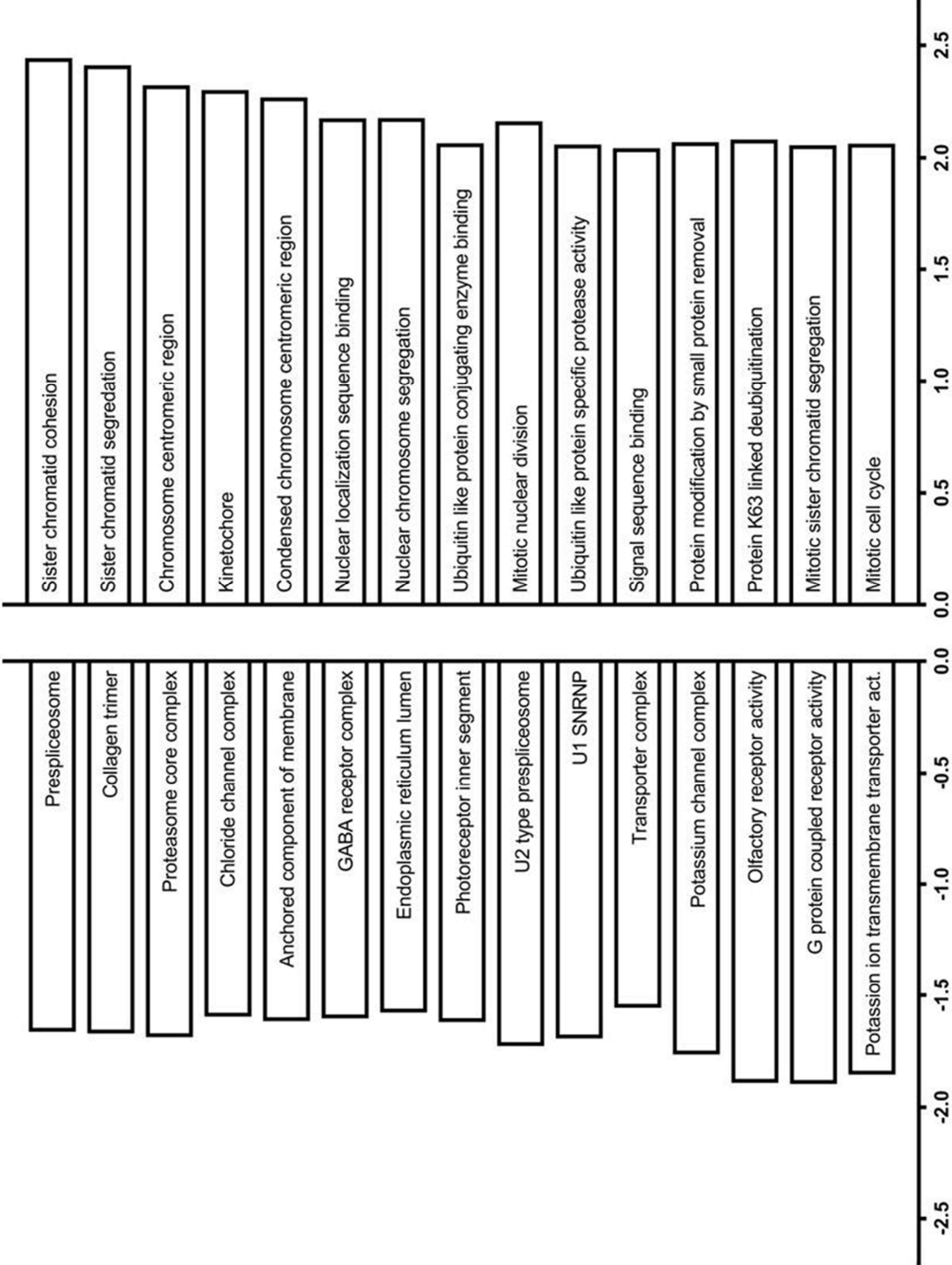


Figure 6: Transcript expression of putative FOXL2 target genes in fibroblasts and glandular epithelial cells. A- Expression of putative target genes in fibroblasts; B- Expression of putative target genes in glandular epithelial cells; Gene expression was quantified by real time RT-PCR using *C2ORF29*, *RPL19* and *SLC30A6* as housekeeping genes. Data are presented as ratio of target gene expression in FOXL2 vs mock transfection (means \pm SEM). We use white bars and light grey bars to easily visualize gene sets.

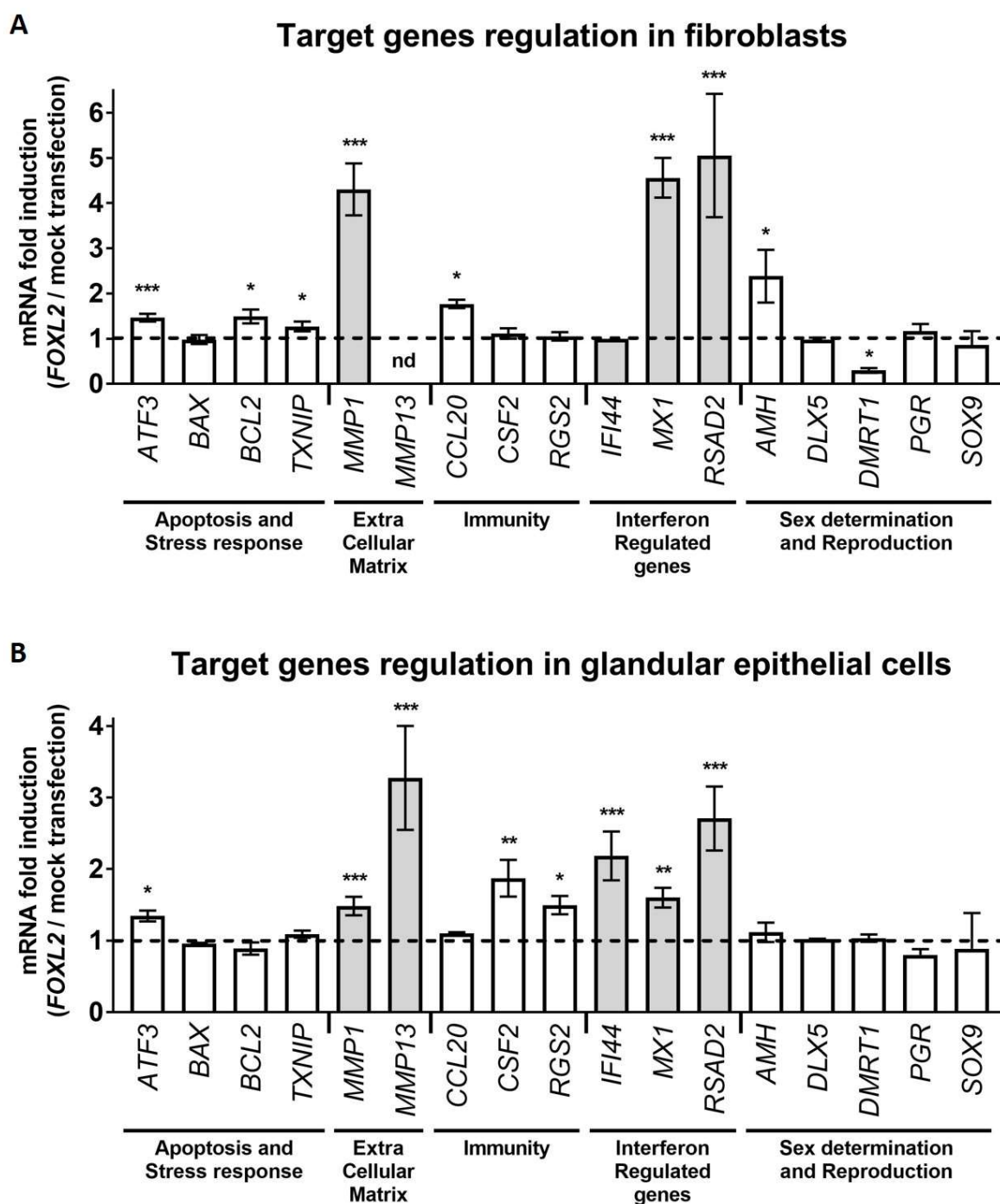


Table S1: Gene Set Enrichment Analysis – Database C5:BP – Epithelial cells

Plasmid	Pathway	Annotated gene number	Enrichment Core gene number	NES	FDR q-value
FOXL2	mRNA processing GO 0006397	63	14	2,63	0,0000
	mRNA metabolic process	73	17	2,60	0,0000
	RNA processing	155	37	2,49	0,0000
	RNA splicing	81	30	2,23	0,0003
	Sister chromatid segregation	16	4	2,25	0,0004
	Chromosome segregation	30	7	2,14	0,0018
	Mitotic sister chromatid segregation	15	3	2,12	0,0022
	Spliceosome assembly	17	5	2,04	0,0071
	Nuclear transport	84	25	1,99	0,0129
	Nucleocytoplasmic transport	83	25	1,97	0,0158
	Cellular component disassembly	28	4	1,92	0,0278
	RNA splicing via transesterification reactions	30	5	1,88	0,0377
	Nuclear import	48	17	1,86	0,0432
	Mitosis	79	13	1,82	0,0547
	Protein amino acid lipidation	24	4	1,83	0,0547
	Protein import into nucleus	46	16	1,82	0,0557
	M phase of mitotic cell cycle	82	13	1,81	0,0561
	Lipoprotein biosynthetic process	26	4	1,77	0,0752
	Negative regulation of DNA metabolic process	17	5	1,73	0,0912
	Chromosome organization and biogenesis	120	12	1,74	0,0921
	Cell cycle process	184	35	1,70	0,1092
	Ribonucleoprotein complex biogenesis and assembly	80	15	1,69	0,1102
	Positive regulation of caspase activity	23	2	1,70	0,1136
	Protein RNA complex assembly	61	12	1,67	0,1245
	Protein import	60	17	1,66	0,1279
	Mitotic cell cycle	146	25	1,65	0,1385
	Cell cycle checkpoint GO 0000075	43	9	1,64	0,1386
	Cell cycle GO 0007049	296	51	1,59	0,1532
	Regulation of cyclin dependent protein kinase activity	41	8	1,61	0,1551
	Fatty acid oxidation	18	2	1,62	0,1559
	Cell cycle phase	162	23	1,61	0,1569
	Chromatin assembly or disassembly	25	8	1,59	0,1570
	Protein targeting	107	28	1,60	0,1608
	DNA replication	93	22	1,61	0,1608
	M phase	108	14	1,55	0,2064
	Macromolecular complex assembly	260	37	1,54	0,2083
	Cellular component assembly	278	39	1,53	0,2096
	Regulation of transferase activity	148	26	1,53	0,2101
	Double strand break repair	23	5	1,53	0,2110
	Rhythmic process	20	4	1,51	0,2192
	ER to Golgi vesicle mediated transport	17	1	1,51	0,2196
DNA integrity checkpoint	22	5	1,49	0,2280	
Intracellular protein transport	140	30	1,49	0,2299	
Regulation of DNA metabolic process	44	13	1,50	0,2301	
Regulation of cell cycle	168	29	1,48	0,2314	
Biopolymer modification	606	77	1,47	0,2327	
Regulation of intracellular transport	24	7	1,48	0,2347	
DNA dependent DNA replication	52	12	1,47	0,2360	
RNA metabolic process	769	92	1,46	0,2362	
Intracellular transport	267	56	1,48	0,2393	
Control					

NES: Normalized Enrichment Score ; FDR: False Discovery Rate

Table S2: Gene Set Enrichment Analysis – Database C5:CC – Epithelial cells

Plasmid	Pathway	Annotated gene number	Enrichment Core gene number	NES	FDR	q-
FOXL2	Spliceosome	48	6	2,44	0,0000	
	Nuclear envelope	67	16	2,35	0,0000	
	Small nuclear ribonucleoprotein complex	22	3	2,26	0,0015	
	Nuclear membrane part	38	9	2,14	0,0027	
	Nuclear pore	28	7	1,93	0,0095	
	Chromosome pericentric region	27	7	1,93	0,0102	
	Endomembrane system	206	31	1,95	0,0107	
	Nuclear part	534	109	1,93	0,0110	
	Envelope	160	20	1,98	0,0118	
	Organelle envelope	160	20	1,95	0,0119	
	Chromosomal part	88	18	1,99	0,0123	
	Nuclear membrane	46	9	1,95	0,0128	
	Spindle	37	9	1,97	0,0131	
	Spindle pole	18	3	1,85	0,0205	
	Spindle microtubule	15	5	1,86	0,0213	
	Microtubule organizing center	63	11	1,80	0,0267	
	Pore complex	33	7	1,81	0,0268	
	Chromosome	114	19	1,76	0,0354	
	Nuclear body	31	6	1,76	0,0355	
	Ribonucleoprotein complex	135	21	1,71	0,0490	
	Kinetochore	23	7	1,71	0,0491	
	Microtubule cytoskeleton	141	19	1,70	0,0492	
	Nucleoplasm	261	56	1,68	0,0528	
	Centrosome	54	9	1,66	0,0588	
	Organelle membrane	286	42	1,66	0,0593	
	Organelle lumen	424	90	1,61	0,0745	
	Membrane enclosed lumen	424	90	1,61	0,0764	
	Ubiquitin ligase complex	26	8	1,60	0,0773	
	Nuclear lumen	360	71	1,59	0,0790	
	Nucleoplasm part	200	42	1,54	0,1034	
	Cell cortex part	21	6	1,52	0,1125	
	DNA directed RNA polymerase complex	17	7	1,50	0,1233	
	Nuclear DNA directed RNA polymerase complex	17	7	1,49	0,1255	
	Proton transporting two sector ATPase complex	15	15	1,49	0,1279	
	DNA directed RNA polymerase II holoenzyme	64	15	1,48	0,1315	
	Cytoskeletal part	219	23	1,47	0,1326	
	Chromatin	31	7	1,43	0,1506	
	Microtubule organizing center part	19	3	1,44	0,1511	
	Endoplasmic reticulum membrane	80	12	1,44	0,1543	
	RNA polymerase complex	17	7	1,42	0,1616	
	Macromolecular complex	889	89	1,40	0,1714	
	Intracellular non membrane bound organelle	582	60	1,39	0,1730	
	Intrinsic to Golgi membrane	15	3	1,38	0,1731	
	Nuclear envelope endoplasmic reticulum network	89	12	1,39	0,1740	
	Cell cortex	35	7	1,40	0,1749	
Non membrane bound organelle	582	60	1,40	0,1767		
Microbody	45	9	1,33	0,2017		
Organelle inner membrane	72	5	1,34	0,2046		
Proteasome complex	23	22	1,34	0,2084		
Endoplasmic reticulum part	90	8	1,34	0,2103		
Control						

NES: Normalized Enrichment Score ; FDR: False Discovery Rate

Table S3: Gene Set Enrichment Analysis – Database C5:MF – Epithelial cells

Plasmid	Pathway	Annotated gene number	Enrichment Core gene number	NES	FDR q-value
FOXL2	RNA splicing factor activity transesterification mechanism	17	7	2,34	0,0000
	Transferase activity transferring alkyl or aryl groups	27	8	2,01	0,0231
	mRNA binding	22	3	1,93	0,0284
	RNA binding	237	38	1,94	0,0349
	Cysteine type peptidase activity	46	12	1,80	0,0845
	RNA polymerase activity	15	5	1,73	0,1267
	Nucleotidyl transferase activity	46	12	1,68	0,1584
	DNA polymerase activity	18	4	1,64	0,1905
Zinc ion binding	79	13	1,57	0,2465	
Control	Voltage gated potassium channel activity	35	26	-1,66	0,1738
	Carbon oxygen lyase activity	30	5	-1,63	0,1782
	Substrate specific channel activity	146	89	-1,70	0,1897
	Serine type endopeptidase activity	34	21	-1,67	0,2000
	Cation channel activity	114	71	-1,61	0,2027
	Hydro lyase activity	26	5	-1,63	0,2071
	Gated channel activity	116	73	-1,59	0,2077
	Structural constituent of muscle	30	30	-1,57	0,2190
	Ion channel activity	140	88	-1,72	0,2246
Protein complex binding	52	25	-1,57	0,2311	

NES: Normalized Enrichment Score ; FDR: False Discovery Rate

Table S4: Gene Set Enrichment Analysis – Database C5:BP – Fibroblastic cells

Plasmid	Pathway	Annotated gene number	Enrichment Core gene number	NES	FDR q-value
FOXL2	Rhythmic process	20	4	2,26	0,006
	DNA catabolic process	22	5	2,20	0,014
	Nuclear organization and biogenesis	25	7	2,14	0,024
	Apoptotic nuclear changes	17	5	2,13	0,021
	Development of primary sexual characteristics	24	3	2,08	0,033
	Positive regulation of caspase activity	23	6	2,01	0,054
	Biopolymer catabolic process	106	19	1,93	0,091
	Skeletal muscle development	31	9	1,83	0,167
	Macromolecule catabolic process	126	21	1,83	0,152
	Regulation of MAPKKK cascade	18	4	1,83	0,140
	Muscle development	90	7	1,81	0,139
	Cell structure disassembly during apoptosis	15	3	1,81	0,131
	Apoptotic program	51	11	1,79	0,134
	Striated muscle development	40	9	1,77	0,145
	Regulation of hydrolase activity	70	16	1,76	0,143
	Cellular component disassembly	28	4	1,76	0,134
	Response to virus	38	8	1,75	0,133
	Cellular protein catabolic process	54	31	1,72	0,164
	Positive regulation of hydrolase activity	48	12	1,66	0,220
	Cellular catabolic process	196	30	1,65	0,223
Protein polymerization	17	8	1,63	0,245	
Control					

NES: Normalized Enrichment Score ; FDR: False Discovery Rate

Table S5: Gene Set Enrichment Analysis – Database C5:CC – Fibroblastic cells

Plasmid	Pathway	Annotated gene number	Enrichment Core gene number	NES	FDR q-value
FOXL2					
Control	Integrin complex	16	7	-1,82	0,064
	Synapse	25	14	-1,68	0,216
	Cell cortex part	21	6	-1,68	0,158
	Cortical cytoskeleton	17	4	-1,65	0,152

NES: Normalized Enrichment Score ; FDR: False Discovery Rate

Table S6: Gene Set Enrichment Analysis – Database C5:MF – Fibroblastic cells

Plasmid	Pathway	Annotated gene number	Enrichment Core gene number	NES	FDR q-value
FOXL2	Protein kinase inhibitor activity	23	12	1,79	0,23
Control	Phosphoric diester hydrolase activity	39	17	-1,99	0,01
	Phospholipase C activity	15	7	-1,82	0,06
	Nucleobase nucleoside nucleotide kinase activity	23	5	-1,75	0,10
	Motor activity	27	12	-1,71	0,12
	Glutamate receptor activity	19	10	-1,67	0,15
	Microtubule motor activity	15	5	-1,63	0,20

NES: Normalized Enrichment Score ; FDR: False Discovery Rate

Table des primers utilisés en RT-qPCR

Gene symbol	Gene description	Sequence (5' → 3')	Tm (°C)	Amplicon size (bp)
C2ORF29	CNOT11 ; CCR4-NOT transcription complex subunit 11	Forward: CCTTCAAGAGCCCCCTGT	59	64
		Reverse: GGGTCCTTTTCCAACCTCTCC	58	
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Forward: GCCGATGCCCCCATGTTTGT	63	151
		Reverse: TCATAAGTCCCCTCCACGATGC	60	
RPL19	Ribosomal protein L19	Forward: CCCCAATGAGACCAATGAAATC	57	73
		Reverse: CAGCCCATCTTTGATCAGCTT	59	
SLC30A6	Solute carrier family 30 member 6	Forward: TGATGAGGAAACCTAGCCCTGCC	57	142
		Reverse: TCGGGCTGCTCCAAAAGCGT	57	
SUZ12	Polycomb repressive complex 2 subunit	Forward: CGTTGTGAGCAGTTTTGCCCTGT	65	140
		Reverse: ACCACAGTGTGGAGTTGGACT	64	
AMH	Anti-Müllerian hormone	Forward: ACATACCAGGCCAACAACTG	58	98
		Reverse: TGCATCTTTAGCAGCAGCAC	59	
ATF3	Activating transcription factor 3	Forward: TGCGGGCCCTCTATTGC	60	65
		Reverse: GCTGGACTCGTGTGTTCTGCTT	64	
BAX	BCL2 associated X	Forward: CTCCCGAGAGGCTTTTTTC	58	176
		Reverse: TCGAAGGAAGTCCAATGTCC	57	
BCL2	BCL2 apoptosis regulator	Forward: TCGTGGCCTTCTTTGAGTTC	58	109
		Reverse: CGGTTCAGGTACTCGGTCAT	59	
CCL20	C-C motif chemokine ligand 20	Forward: AGCTGTGTGTGCAGATCCAAAG	59	100
		Reverse: CATTCCAGGGAGCATCCATT	58	
CSF2	Colony stimulating factor 2	Forward: TGCAGGGCAGCCTCACTAGT	60	100
		Reverse: TGGGTTCCACAGGAAGTTTCC	60	
DMRT1	Doublesex and mab-3 related transcription factor 1	Forward: GAGTCCCAGTACAGGATGCATT	60	90
		Reverse: GGGCTGTCCCTCAAAGTGAAGA	60	
HMMR	Hyaluronan mediated motility receptor	Forward: TGAGCAAAGTGCAGAGGATGTC	59	100
		Reverse: TGCTGATTTGGTCTGCAGATCT	59	
IFI44	Interferon induced protein 44	Forward: CTGGTTTACAAAAGTTTCGCAAT	60	100
		Reverse: CGTTACATGGCCTCGGAAA	58	
MMP1	Matrix metalloproteinase 1	Forward: TGGACCAGCAATTTCCAAGAT	58	100
		Reverse: TCAGAGCCCCAATGTCAGTAGA	58	
MMP13	Matrix metalloproteinase 13	Forward: CACAATGGCACTGTGATATCA	58	100
		Reverse: GGAAAGCGTGAGCCAACAGA	60	
MX1	MX dynamin like GTPase 1	Forward: AATCCCAGGTCTCAGAGCCC	61	121
		Reverse: CGGAGCACGAAGAACTGGA	60	
MX2	MX dynamin like GTPase 2	Forward: CAGAGACGCCTCAGTCGAAGC	63	121
		Reverse: TGATTGGCGAGACGTTTGCT	60	
PGR	Progesterone receptor	Forward: CACCATCCCTGCCAATATCTTG	60	227
		Reverse: CAAGATATTGGCAGGGATGGTG	60	
RGS2	Regulator of G-protein signaling 2	Forward: CTTGAATTCAGCCTGGGTGTTC	60	110
		Reverse: CTGCCCCAGTACCAGCTTCT	62	
RSAD2	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2	Forward: ACTGGACCTGGCTTTTCTGTGA	61	99
		Reverse: ACGTTGCCCTAGATTACATCCTTATT	60	
SOX9	SRY-box 9	Forward: AGCCGAACACTGGCGAAAAG	61	100
		Reverse: GGTTCCTGTGTGAGAATCAC	60	
TXNIP	Thioredoxin interacting protein	Forward: CCTTCTATCTGGGCTGCAATATC	59	120
		Reverse: GCCTGACCTGTGCCAATA	58	
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	Forward: GGATGTCACCAGGACGTTTAATG	60	90
		Reverse: GAGCCACTGGAGCTGAGGTT	62	

4. Expression des gènes cibles de FOXL2 dans l'endomètre

Notre étude identifie pour la première fois des gènes cibles de FOXL2 dans les cellules endométriales bovines. Nous avons analysé l'expression de cinq d'entre eux (*AMH*, *DMRT1*, *MMP1*, *MMP13* et *RGS2*) dans un modèle *in vivo* de femelles cyclées ou gravides dont l'endomètre est prélevé après abattage à 16 ou 20 jpo. Les gènes régulés par l'IFN n'ont pas été analysés dans ce modèle car leur expression est fortement stimulée par les sécrétions trophoblastiques d'IFNT au cours de la gestation précoce (Mansouri-Attia *et al.*, 2009b) et cette stimulation masque toute autre régulation. L'expression de *DLX5* a été analysée en parallèle car, même s'il n'est pas régulé par FOXL2 dans les cellules endométriales bovines, c'est un gène majeur de la fonction endométriale chez la souris (Bellessort *et al.*, 2016) et il n'a encore jamais été étudié chez les ruminants.

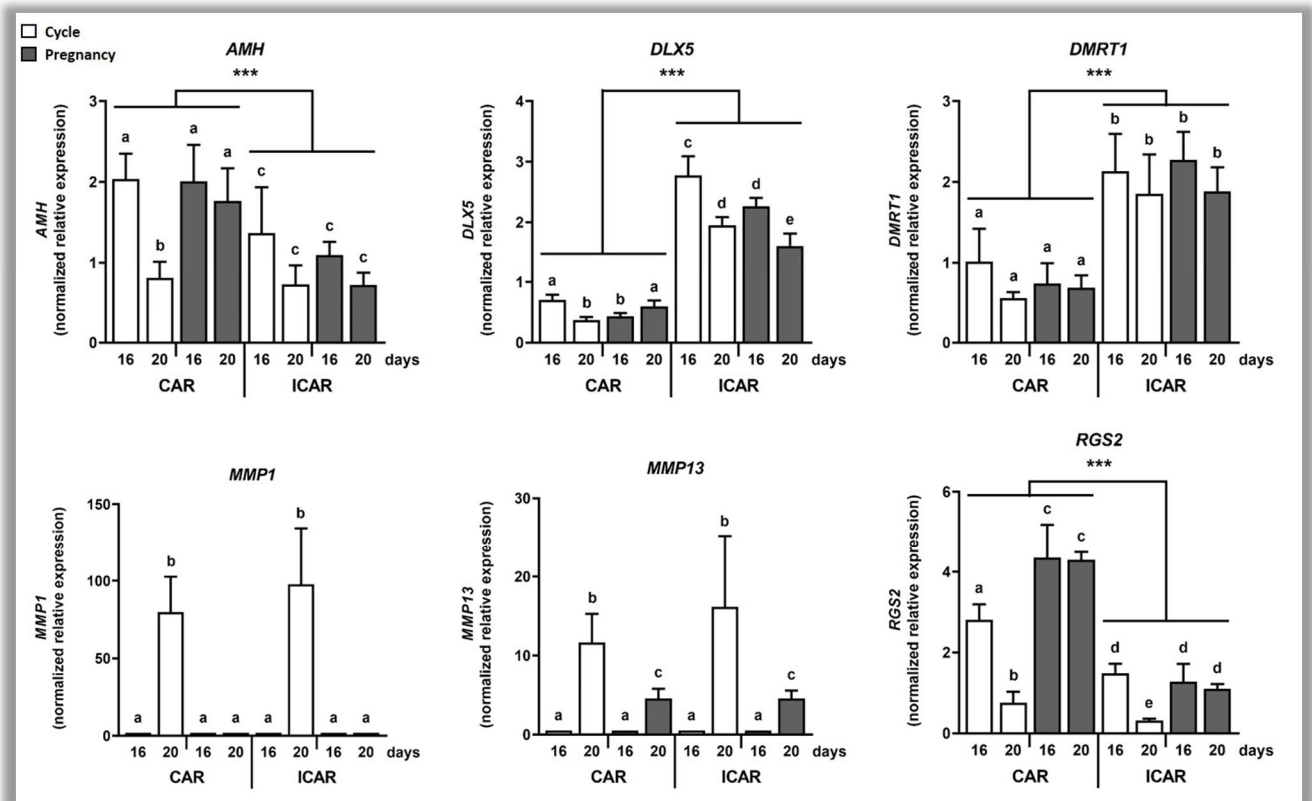


Figure 48 : Expression de gènes cibles de FOXL2 dans l'endomètre bovin au cours du cycle œstral et de la gestation précoce. Les tissus CAR et ICAR ont été prélevés après abattage et dissection de l'endomètre de génisses de race Cross-Bred cyclées (n=5 à 16 jpo ; n=6 à 20 jpo) ou gestantes (n=4 à 16 jpo ; n=5 à 20 jpo). L'expression des transcrits est analysée par RT-qPCR et normalisée par rapport à l'expression des gènes de ménage *RPL19* et *SUZ12* (Qbase Plus Software). Les lettres différentes indiquent des valeurs différentes ($P < 0,05$). Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM (***) : $P < 0,001$).

L'*AMH* est exprimé dans les zones CAR et ICAR au cours du cycle œstral et de la gestation précoce. La quantité d'ARNm est significativement plus grande dans les CAR (1,70 ; $P < 0,001$; Fig 48). L'expression de l'*AMH* diminue pendant la phase folliculaire (à 20 jpo) par rapport à la phase lutéale (0,39 ; $P < 0,05$) dans la région CAR uniquement. Pendant la gestation précoce, le taux de transcrits *AMH* ne varie pas et est équivalent à celui du 16^{ème} jour de cycle. Le gène *DMRT1* quant à lui est significativement plus exprimé dans les tissus ICAR (2,74 ; $P < 0,001$; Fig 48) mais il n'est pas régulé au cours du cycle ou de la gestation précoce. Les analyses *in vitro* ont montré que *FOXL2* stimule l'expression de l'*AMH* et réprime celle de *DMRT1* dans les cellules endométriales. *In vivo*, l'expression de *FOXL2* est significativement augmentée en phase folliculaire soit à 20 jpo (Fig 21). Les taux de transcrits *AMH* et *FOXL2* sont négativement corrélés dans les CAR. Il y a donc une différence de régulation de l'*AMH* par *FOXL2* entre les deux modèles. Enfin, il n'y a pas de corrélation entre l'expression de *DMRT1* et *FOXL2 in vivo*.

Les MMPs sont exprimées dans les tissus CAR et ICAR mais uniquement pendant certaines phases du cycle ou de la gestation précoce. Il n'y a pas de différence d'expression de *MMP1* et *MMP13* entre CAR et ICAR (Fig 48). Le gène *MMP1* est exprimé exclusivement en phase folliculaire (20 jpo). Le gène *MMP13* est exprimé au 20^{ème} jour de cycle et de gestation avec une variation d'un facteur 2,56 ($P < 0,001$). En phase folliculaire les expressions de *FOXL2* et des MMPs sont corrélées. *FOXL2* stimule donc leur expression *in vitro* et *in vivo*. Cependant le transcrit *MMP13* n'est pas détectable dans les fibroblastes *in vitro* or il est présent dans les CAR, la région aglandulaire de l'endomètre. Il semble donc que les fibroblastes expriment *MMP13 in vivo* mais que le gène s'éteint lors de la mise en culture.

Le taux de transcrit *RGS2* est significativement plus important dans les zones CAR (2,93 ; $P < 0,001$; Fig 48). Au cours du cycle œstral, l'expression du gène *RGS2* est diminuée à 20 jpo (0,27 et $P < 0,001$ en CAR ; 0,21 et $P < 0,01$ en ICAR). De plus dans les CAR, *RGS2* est augmenté à 16 et 20 jour de gestation par rapport à la phase lutéale (1,55 ; $P < 0,01$) et à la phase folliculaire (5,68 ; $P < 0,001$). Les expressions de *FOXL2* et *RGS2* sont négativement corrélées *in vivo* alors que *FOXL2* stimule l'expression de *RGS2 in vitro*. La régulation est donc différente dans les deux modèles.

Le gène *DLX5* code pour un facteur de transcription impliqué dans le développement et la réparation osseuse (Robledo *et al.*, 2002). *DLX5* participe au développement craniofacial, à la différenciation des ostéoblastes et est exprimé dans les cellules de Leydig (Robledo *et al.*, 2002; Bouhali *et al.*, 2011). Dans l'ovaire murin, *Foxl2* et *Dlx5* se régulent réciproquement. *FOXL2* active l'expression de *Dlx5* dans les cellules de la granulosa alors que *DLX5* réprime l'expression de *Foxl2* dans le follicule secondaire et jusqu'au développement du follicule antral (Bouhali *et al.*, 2011). Dans l'endomètre de souris, *Dlx5* participe au développement de l'endomètre et à sa maturation post natale (Bellessort *et al.*, 2016). Il est exprimé dans les épithélia luminal et glandulaire et est nécessaire pour l'adénogenèse et la formation de la lumière au sein des glandes endométriales.

Dans l'endomètre bovin, la protéine *DLX5* est localisée exclusivement dans le noyau des cellules endométriales et majoritairement dans les épithélia luminal et glandulaire (Fig 49). Le marquage de *DLX5* est plus intense dans les glandes endométriales pendant la gestation précoce alors que la protéine *FOXL2* est plus fortement exprimée au cours du cycle œstral. Tout comme dans l'ovaire de souris, les protéines *DLX5* et *FOXL2* semblent s'inhiber mutuellement.

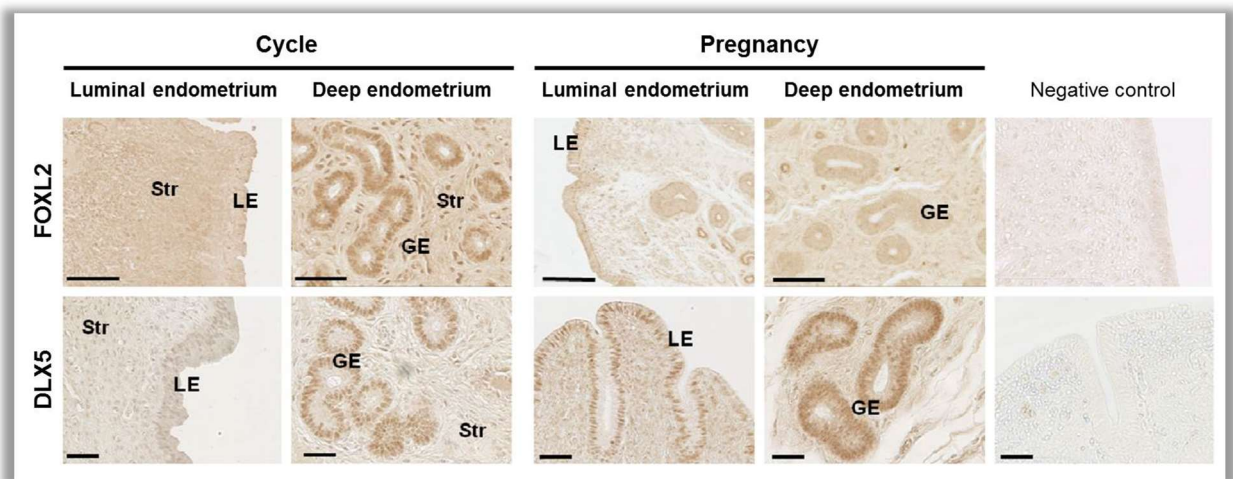


Figure 49 : Localisation cellulaire des protéines FOXL2 et DLX5 dans l'endomètre bovin.

Les protéines d'intérêt sont détectées par immunohistochimie (C. Eozenou) réalisée sur des coupes d'endomètre de génisse Charolaise prélevé à 20 jpo après abattage ; GE : épithélium glandulaire ; Str : Stroma ; LE : épithélium luminal ; échelle = 50 µm.

DLX5 est exprimé dans les deux zones de l'endomètre (Fig 48) mais le taux de transcrits est plus élevé en ICAR qu'en CAR (4,08 ; $P < 0,001$). L'expression de *DLX5* diminue entre le 16^{ème} et le 20^{ème} jour du cycle œstral (0,53 et $P < 0,05$ en CAR ; 0,70 et $P < 0,01$ en ICAR). Pendant la gestation son expression augmente en CAR (1,37 ; $P < 0,05$) et diminue en ICAR (0,70 ; $P < 0,01$). Tout comme dans l'ovaire de souris, les transcrits et les protéines FOXL2 et DLX5 sont négativement corrélés dans l'endomètre bovin. Or dans les cultures primaires de cellules endométriales bovines, le gène *DLX5* n'est pas régulé par FOXL2. Il n'existe donc pas de régulation réciproque entre ces deux gènes mais *FOXL2* apparaît comme un gène cible putatif de DLX5 dans l'endomètre bovin.

5. Conclusions de l'article 2

Grâce aux analyses transcriptomiques et bioinformatiques, plusieurs fonctions biologiques ont été identifiées comme régulées par FOXL2 dans les cellules endométriales bovines. Les résultats du microarray ont été validés par RT-qPCR sur une sélection de gènes issus des « gene set » identifiés. Ainsi nous avons montré la régulation de gènes associés à la réponse au stress et à l'apoptose (*BCL2*, *ATF3* et *TXNIP*), à l'immunité (*CCL20*, *CSF2*, *RGS2*), à la réponse aux interférons de type I (*MX1*, *MX2*, *RSAD2* et *IFI44*), à la modification de la matrice extra cellulaires (*MMP1* et *MMP13*) et enfin à la détermination sexuelle (*AMH* et *DMRT1*). Certains de ces gènes sont régulés par FOXL2 dans d'autres modèles tels que les cellules KGN (Batista *et al.*, 2007; Benayoun *et al.*, 2009) et les ovaires murins (Uhlenhaut *et al.*, 2009; Bouhali *et al.*, 2011) ou caprins (Elzaiat *et al.*, 2014). En revanche les gènes *MX1*, *MX2* (voir article 1), *RSAD2*, *IFI44*, *MMP1* et *MMP13* sont régulés par FOXL2 exclusivement dans les cellules endométriales. De ces groupes de gènes cibles, nous avons pu déduire les fonctions endométriales régulées par FOXL2 comme la protection contre les infections, l'immuno tolérance du conceptus et la migration des cellules immunitaires. Ces fonctions sont cruciales pour la mise en place de la réceptivité utérine.

La régulation des gènes cibles de FOXL2 varie entre les fibroblastes et les cellules EG dans l'endomètre bovin. Comme nous l'avons vu précédemment, l'expression de *PTGS2* est stimulée par FOXL2 dans les cellules KGN (Batista *et al.*, 2007) alors qu'elle est inhibée dans les cellules 293T et MDA-MB-231 (Kim *et al.*, 2009). Il est donc nécessaire considérer le contexte cellulaire pour comprendre le rôle biologique de ce facteur de transcription. FOXL2 module l'expression de ses gènes cibles en se liant à des co-facteurs. Il peut être activateur ou répresseur en fonction des partenaires disponibles. FOXL2 stimule l'expression de *MMP1* et *MMP13* dans les modèles *vivo* et *vitro*. Cependant les gènes *AMH* et *RGS2* sont stimulés *in vitro* et réprimés *in vivo*. Cette différence peut être expliquée par les interactions présentes entre les différents types cellulaires dans l'endomètre. L'analyse des transcriptomes des fibroblastes et des cellules EG *in vivo* après séparation des deux types cellulaires par microdissection laser permettrait de valider notre hypothèse.

L'analyse transcriptomique a mis en évidence de nombreux gènes régulés par *FOXL2* qui n'ont pas pu tous être traités ici. Des analyses complémentaires sont donc nécessaires pour exploiter l'ensemble des résultats obtenus. Le gène *FOXL2* apparaît comme un gène clé de la physiologie endométriale bovine. Les résultats obtenus sont comparables à ceux décrits dans la littérature chez la brebis ou chez la chèvre. Cependant nous observons des différences avec les modèles humains et murins. D'un point de vue évolutif, l'endomètre est un tissu présent uniquement chez les mammifères alors que les ovaires existent chez tous les vertébrés. Il semble donc que *FOXL2* a gagné de nouvelles fonctions biologiques avec l'apparition d'un nouvel organe : l'utérus.

DISCUSSION

GENERALE

Bilan des résultats obtenus

La réceptivité endométriale est un état physiologique observé pendant une période restreinte au cours de laquelle l'endomètre accepte l'implantation du conceptus (Tu *et al.*, 2014). Des interactions moléculaires et cellulaires s'établissent entre les deux entités. Ce processus nécessite une coordination complexe des différents types cellulaires sous l'effet d'une large gamme de signaux extracellulaires parmi lesquels se trouvent les hormones stéroïdiennes. La qualité de l'endomètre est cruciale pour la réussite de l'implantation. Les perturbations de l'environnement ou de la physiologie maternelle affectent la fonction endométriale et peut impacter le développement du conceptus avec des conséquences sur les performances zootechniques de la descendance à l'âge adulte (Gonzalez-Recio *et al.*, 2012).

La production intensive de lait génère un stress métabolique chez la femelle et conduit à une diminution de sa fertilité (Butler, 2003b). Dans le cadre de ma thèse, par une approche gène candidat, nous avons mis en évidence la modification du transcriptome endométrial à l'implantation (19 jpo) associée à la lactation. L'endomètre est capable d'adapter sa physiologie en réponse à un conceptus dont la qualité est altérée (Macklon and Brosens, 2014; Sandra *et al.*, 2015). Nous avons analysé l'expression des gènes régulés par la présence du conceptus. La perturbation du métabolisme maternel n'affecte pas la capacité de l'endomètre à répondre aux signaux embryonnaires.

L'expression des enzymes antioxydantes a été pour la première fois mise en évidence dans l'endomètre bovin. Les transcrits des enzymes *CAT* et *SOD1* ne varient pas au cours du cycle œstral ou de la gestation précoce. L'expression de *SOD2* quant à elle est significativement augmentée dans le tissu ICAR à l'implantation. Cette variation de *SOD2* est conservée chez les ruminants et indépendante des sécrétions trophoblastiques d'IFNT (Al-Gubory *et al.*, 2016). La production de ROS dans l'endomètre est un processus naturel lors de la mise en place de la placentation. Cependant les perturbations du métabolisme maternel provoquent une augmentation des ROS. Les femelles tarées immédiatement après le vêlage présentent une diminution significative de l'expression des enzymes *CAT* et *SOD1*, ce qui suggère une réduction du stress oxydatif dans l'endomètre. L'augmentation du stress oxydatif pendant la vie fœtale entraîne de fortes perturbations

du métabolisme de la descendance et peut être à l'origine de pathologies métaboliques à l'âge adulte (Igosheva *et al.*, 2010; Jarvie *et al.*, 2010).

Enfin l'analyse de l'expression de *FOXL2* a mis en évidence sa régulation différentielle dans les tissus ICAR entre les vaches en lactation et les vaches tarées. Contrairement aux données précédemment publiées par l'équipe (Eozenou *et al.*, 2012 ; Eozenou *et al.*, to be submitted, Annexe 4), la variation de transcrits *FOXL2* n'est pas corrélée au taux de P4 plasmatique dans ce modèle. Dans les cellules KGN, *SOD2* est un gène cible de *FOXL2* (Batista *et al.*, 2007), mais l'expression des enzymes antioxydantes n'est pas affectée par le facteur de transcription dans les cultures primaires des cellules endométriales bovines.

FOXL2 est le gène majeur de la différenciation et le maintien de la fonction ovarienne (Cocquet *et al.*, 2002) mais il a aussi un rôle crucial dans la fonction hypophysaire (Ellsworth *et al.*, 2003; Blount *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2013). Les mutations du gène *FOXL2* dans l'ovaire provoquent l'apparition d'insuffisance ovarienne précoce ou de tumeurs de la granulosa (Crisponi *et al.*, 2001; Uda *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2009; Verdin and De Baere, 2012). La fonction ovarienne est alors perturbée et la fertilité diminuée. Bien que décrit dans l'endomètre de plusieurs espèces (Eozenou *et al.*, 2012; Bellessort *et al.*, 2014; Governini *et al.*, 2014), le rôle de *FOXL2* dans la physiologie utérine est encore inconnu. Il a récemment été montré que *FOXL2* est surexprimé dans les tissus endométriaux ectopiques des femmes atteintes d'endométriose (Governini *et al.*, 2014) et que son taux de transcrit est corrélé avec celui de l'activine A.

La deuxième partie de mon projet visait à identifier pour la première fois les gènes cibles de *FOXL2* dans les cellules endométriales bovines par génomique fonctionnelle. La régulation des gènes cibles varie en fonction du type cellulaire considéré. Nous avons montré que *FOXL2* pourrait participer à la protection de l'interface materno-fœtale contre les infections, à la mise en place de l'immuno tolérance du conceptus, au remodelage du tissu endométrial et enfin au maintien de l'identité femelle du tractus reproducteur.

Forces et limites des modèles utilisés

Dans le cadre de mes recherches, deux modèles expérimentaux ont été utilisés. Ils présentent chacun des forces et des limites que nous allons discuter.

Modèle *vivo* : Métabolisme maternel contrasté à l'implantation

Ce modèle a été développé par nos collègues de l'université de Dublin (P. Lonergan et N. Forde) et fait partie d'un projet de recherche européen visant à comprendre l'effet du métabolisme sur les interactions entre la mère et le conceptus à 19 jpo chez les vaches laitières.

En 2012, l'équipe de WW. Tatcher a publié un modèle *vivo* de métabolisme contrasté mettant en jeu des vaches primipares en lactation ou tarées et des génisses. Les femelles ont été synchronisées puis inséminées le jour de l'œstrus. L'endomètre est prélevé après l'abattage des animaux à 17 jpo (Cerri *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2012). Dans ce modèle, la lactation affecte le métabolisme de la mère mais il est impossible de déterminer si les variations d'expression des gènes endométriaux sont dues à des perturbations du tractus reproducteur en lui-même ou à son adaptation face à un conceptus dont la qualité serait altérée. En effet, les concepti sont produits par IA des femelles LACT et DRY. Or le métabolisme maternel impacte la composition du fluide folliculaire donc le développement de l'ovocyte (Forde *et al.*, 2015) et la qualité du conceptus. L'endomètre est capable de capter ces variations de qualité embryonnaire et d'adapter sa réponse afin de maintenir la gestation (Mansouri-Attia *et al.*, 2009a). Afin de s'affranchir de cet effet « conceptus » dans le nouveau modèle de métabolisme contrasté, les embryons ont été produits *in vivo* par IA dans une génisse donneuse et transférés à 7 jpo dans les vaches receveuses LACT et DRY.

A 19 jpo, les endomètres des femelles gestantes ont été disséqués afin de séparer les zones CAR et ICAR. Seules les zones ICAR ont été analysées par RNAseq par l'équipe de S. Bauersachs (2017). L'expression de nombreux gènes endométriaux varie à l'implantation entre les vaches et les génisses cependant ils observent peu de différence entre les vaches LACT et DRY. Dans le cadre de ma thèse, les transcrits ont été analysés par RT-qPCR. Cette approche gène-candidat est plus sensible qu'une analyse transcriptomique globale et a permis de mettre en évidence des variations d'expression plus faibles. De plus les tissus

CAR et ICAR ont pour la première fois été analysés en parallèle et comparés dans un modèle de métabolisme contrasté. Nous avons ainsi montré que la zone ICAR était la plus affectée par la lactation.

Dans ce modèle, seuls les endomètres des femelles gestantes à 19 jpo ont été analysés. Or si le conceptus a été retrouvé, cela signifie que la fertilité des femelles était suffisante pour maintenir la gestation, du moins jusqu'à l'implantation. Il aurait été intéressant d'analyser les tissus des femelles non gravides afin de comprendre l'origine des échecs de gestation.

Comme nous l'avons vu précédemment l'endomètre est un tissu complexe. Les zones CAR et ICAR contiennent plusieurs types de cellules dont nous ne pouvons pas appréhender la répartition dans chaque échantillon. L'analyse du tissu dans son ensemble permet d'identifier les variations d'expression des gènes dans les principaux types cellulaires que sont les fibroblastes et les cellules EG. Cependant les cellules épithéliales luminales, immunitaires et endothéliales sont essentielles pour la mise en place de la réceptivité utérine et le maintien de la gestation. Leur étude nécessiterait la mise au point de protocoles d'isolement spécifiques.

Enfin dans notre modèle les femelles sont abattues à 19 jpo. Le transcriptome de l'endomètre est donc analysé à un instant donné. Nous avons montré lors du premier chapitre que l'endomètre pouvait être prélevé par biopsies. La quantité de tissu ainsi obtenu (100 à 150 mg) est alors suffisante pour une analyse transcriptomique. Cette approche permettrait de prélever plusieurs fois les mêmes animaux et ainsi de mettre en place un suivi *post partum* des femelles LACT et DRY. De plus il ne serait plus nécessaire d'abattre les animaux et ils pourraient être réutilisés dans d'autres protocoles expérimentaux. En mutualisant ainsi les animaux, le coût des protocoles serait diminué et les effectifs pour chaque groupe pourraient potentiellement être augmentés afin d'améliorer la puissance statistique de nos études.

Modèle vitro : Surexpression de *FOXL2* dans les cultures primaires de cellules endométriales bovines

La ChIP, ou immuno précipitation de la chromatine, permet d'identifier les sites de fixations d'une protéine d'intérêt sur l'ADN. Réalisée à partir de tissu endométrial et d'un anticorps dirigé contre la protéine FOXL2 bovine, cette technique permettrait d'identifier les gènes cibles de FOXL2 *in vivo*. Cependant les anticorps dirigés contre la protéine FOXL2 bovine, qu'ils proviennent d'un fournisseur ou ils aient été produits à notre demande (thèse C. Eozenou), ne sont pas suffisamment performants pour la ChIP. Nous avons donc opté pour l'utilisation de cellules endométriales bovines surexprimant FOXL2. Une lignée de cellules épithéliales endométriales d'origine bovine (BenEpC, Cryovial) est disponible mais nous avons choisi de travailler à partir de cultures primaires afin de rester le plus proche possible des cellules présentes dans l'endomètre *in vivo*. Des cultures primaires de fibroblastes et de cellules EG ont été développées en parallèle à partir de biopsies utérines de génisses de race Holstein.

Au sein de l'endomètre, les fibroblastes et les cellules EG communiquent en permanence avec leur environnement et s'organisent en trois dimensions. Dans notre modèle *in vitro*, les fibroblastes et les cellules EG sont cultivés séparément et forment un tapis cellulaire à deux dimensions au fond de la boîte de culture. Ce modèle est classiquement utilisé dans les études de génomique fonctionnelle. Il est cependant possible de cultiver les cellules en trois dimensions et/ou en co culture pour mimer leur comportement *in vivo*. Ces cultures peuvent également être transfectées (Xu *et al.*, 2016) mais les technologies actuellement disponibles ne sont pas adaptées aux cellules difficiles à transfectées telles que les cellules EG bovines.

Discussion et perspectives

Les modifications post traductionnelles de FOXL2

Les travaux de C. Eozenou ont mis en évidence la régulation de l'expression de *FOXL2* par la P4 au cours du cycle œstral (Eozenou *et al.*, 2012 ; Eozenou *et al.*, to be submitted, annexe 5). Cependant, l'expression de *FOXL2* est affectée par le métabolisme maternel alors que les taux de P4 ne varient pas entre les vaches en lactation et les tarries. Il existe donc dans l'endomètre un ou plusieurs autres facteurs capables de réguler l'expression du transcrite *FOXL2* ou l'activité de la protéine. La protéine FOXL2 peut subir plusieurs modifications post traductionnelles qui vont affecter son activité biologique, sa localisation cellulaire ou encore sa liaison avec les partenaires (Pisarska *et al.*, 2011).

La sumoylation est une modification post traductionnelle qui aboutit à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) sur une lysine acceptrice de la protéine cible. Dans l'ovaire murin, l'enzyme Ubc9 (Ubiquitin Conjugating Enzyme 9) interagit avec la protéine FOXL2 et lui transfère un groupement SUMO. Cette modification est indispensable pour l'inhibition du gène StAR (Steroidogenic Acute Regulatory). Ce mécanisme permet de bloquer la différenciation des cellules de la granulosa et ainsi de contrôler le développement des follicules (Kuo *et al.*, 2009; Georges *et al.*, 2011).

La phosphorylation de FOXL2 stimule son activité biologique. Dans l'ovaire, en absence de la kinase Last1 (Large tumour suppressor 1), FOXL2 n'est pas phosphorylée et son activité est diminuée. Les souris présentent alors un phénotype semblable à l'insuffisance ovarienne précoce observée lors de la déplétion du gène *Foxl2* (Georges *et al.*, 2013b). Enfin l'acétylation de FOXL2 stimule son activité biologique. Cette modification apparaît en cas de stress oxydatif ou encore thermique dans les cellules KGN. Lorsque la production de ROS est trop importante, l'acétylation de FOXL2 stimule son recrutement sur le promoteur du gène *Sod2* et donc l'expression de l'enzyme antioxydante (Pisarska *et al.*, 2011). La régulation réciproque entre *Foxl2* et *Sirt1* (Sirtuin 1), une désacétylase, permet aussi de moduler l'activité de FOXL2 dans ces cellules (Benayoun *et al.*, 2011).

En tant que facteur de transcription, FOXL2 module l'expression de ces gènes cibles. Les modifications post traductionnelles ont un rôle crucial dans la régulation de son activité biologique. Lors de l'analyse des gènes cibles de FOXL2 dans le chapitre 3, nous avons supposé que les différences de régulation de l'*AMH* et de *RGS2* entre les modèles *vivo* et *vitro* étaient dues à la disponibilité des cofacteurs dans les deux systèmes. Cependant les modifications post traductionnelles de FOXL2 peuvent aussi être à l'origine de cette variation.

Evolution du facteur de transcription FOXL2 chez les vertébrés

Chez les plantes comme chez les animaux, la reproduction est une fonction critique pour le maintien de l'espèce (Lodé, 2012). L'utérus est un organe spécifique des mammifères, dérivé des canaux de Müller. L'organogenèse, la morphogenèse et la différenciation fonctionnelle de l'organe sont des processus complexes (Spencer *et al.*, 2012). La perturbation de l'environnement utérin affecte profondément le développement du fœtus. Chez les mammifères, nous observons une conservation des voies de signalisations de la fonction reproductive.

L'étude comparative de la séquence protéique de FOXL2 révèle que la séquence *Forkhead* présente environ 95% d'homologie chez les vertébrés et la séquence polyAlanine 100% d'homologie chez les mammifères. Chez ces derniers, l'expression ovarienne de *FOXL2* débute au cours du développement embryonnaire précoce, avant même l'initiation de la folliculogenèse, et persiste jusqu'à l'âge adulte (Cocquet *et al.*, 2002). Chez les vertébrés non mammifères, la protéine FOXL2 est également exprimée précocement lors du développement des gonades de la femelle. Chez ces espèces il existe également un dimorphisme sexuel avec une absence d'expression de *Foxl2* dans les gonades mâles de coq et une expression présente mais faible dans les gonades mâles de tortue (Loffler *et al.*, 2003). Le pattern d'expression du gène *FOXL2* est lui aussi fortement conservé ce qui en fait un gène majeur du développement et du maintien des gonades femelles chez les vertébrés.

Récemment l'expression de *FOXL2* a été mise en évidence dans l'endomètre chez plusieurs espèces de mammifères (Eozenou *et al.*, 2012; Bellessort *et al.*, 2014; Governini *et al.*, 2014). Au cours de ma thèse, nous avons identifié des fonctions biologiques régulées par *FOXL2* dans les cellules endométriales. Certaines d'entre elles sont communes aux fonctions régulées par *FOXL2* dans l'ovaire alors que d'autres sont spécifiques de du tissu utérin. Il semble que le gène *FOXL2* ait acquis de nouvelles fonctions avec l'apparition d'un nouvel organe chez les mammifères. *FOXL2* a un rôle crucial dans la physiologie des trois principaux organes de l'axe reproducteur (Fig 50) ce qui en fait un gène majeur de la détermination du sexe (Yano *et al.*, 2012).

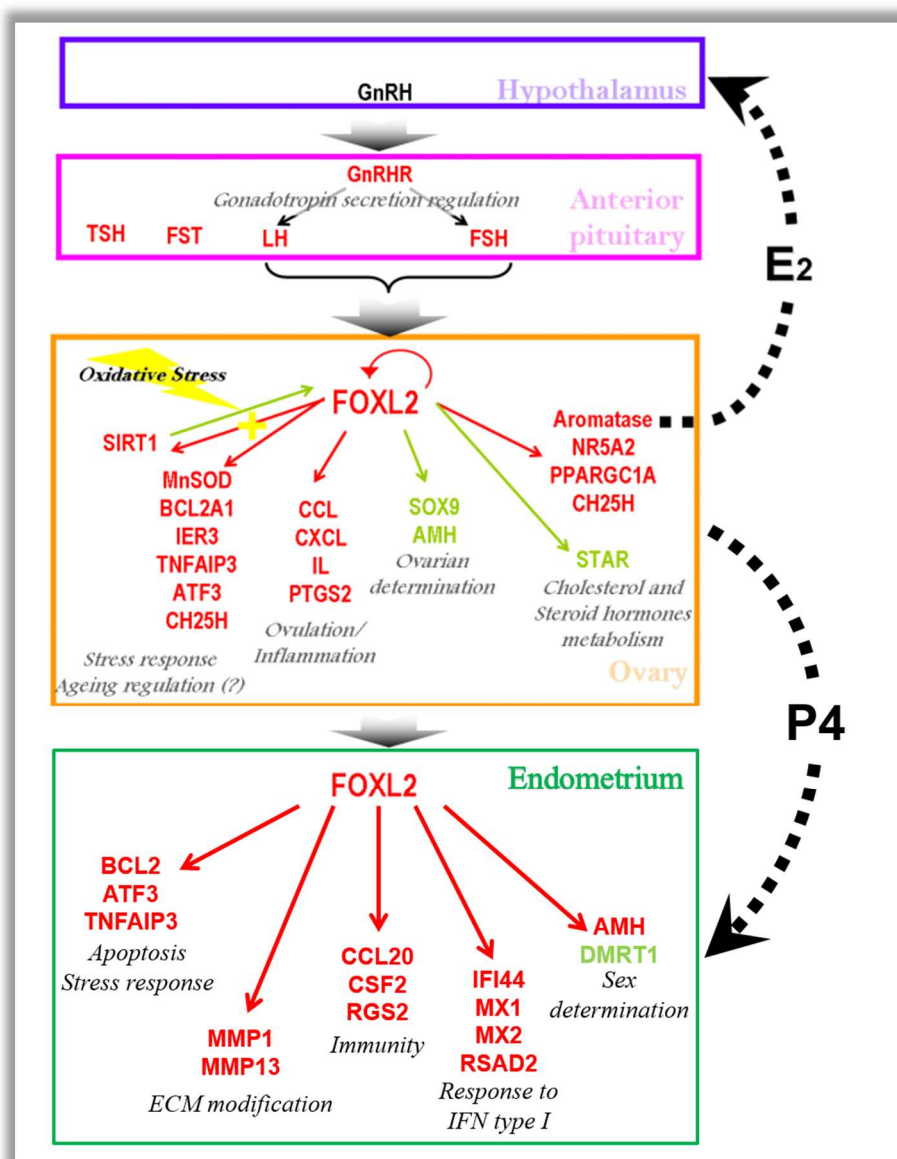


Figure 50 : Mise à jour des gènes cibles de *FOXL2* dans l'axe reproducteur chez la femelle.

Les gènes en rouge sont stimulés par *FOXL2* alors que les gènes en vert sont inhibés (d'après C. Eozrnou ; adapté de Benayoun and Veitia, 2011).

REFERENCES

- Al-Gubory KH and Garrel C** (2012) Antioxidative signalling pathways regulate the level of reactive oxygen species at the endometrial-extraembryonic membranes interface during early pregnancy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **44** 1511–1518.
- Al-Gubory KH, Bolifraud P and Garrel C** (2008) Regulation of key antioxidant enzymatic systems in the sheep endometrium by ovarian steroids. *Endocrinology* **149** 4428–4434.
- Al-Gubory KH, Fowler PA and Garrel C** (2010) The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **42** 1634–1650.
- Al-Gubory KH, Garrel C, Sugino N and Fowler PA** (2016) The conceptus induces a switch in protein expression and activities of superoxide dismutase 1 and 2 in the sheep endometrium during early pregnancy. *Small Ruminant Research* **141** 77–83.
- Alexeyev M, Shokolenko I, Wilson G and LeDoux S** (2013) The maintenance of mitochondrial DNA integrity--critical analysis and update. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**.
- Arosh J a, Parent J, Chapdelaine P, Sirois J and Fortier M a** (2002) Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. *Biology of Reproduction* **67** 161–169.
- Asdell SA** (1944) THE GENETIC SEX OF INTERSEXUAL GOATS AND A PROBABLE LINKAGE WITH THE GENE FOR HORNLESSNESS. *Science (New York, N.Y.)* **99** 124.
- Bartol FF, Wiley AA, Coleman DA, Wolfe DF and Riddell MG** (1988) Ovine uterine morphogenesis: effects of age and progestin administration and withdrawal on neonatal endometrial development and DNA synthesis. *Journal of Animal Science* **66** 3000–3009.
- Batista F, Vaiman D, Dausset J, Fellous M and Veitia R a** (2007) Potential targets of FOXL2, a transcription factor involved in craniofacial and follicular development, identified by transcriptomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** 3330–3335.
- Bauersachs S and Wolf E** (2012) Transcriptome analyses of bovine, porcine and equine endometrium during the pre-implantation phase. *Animal Reproduction Science* **134** 84–94.
- Bauersachs S and Wolf E** (2013) Immune aspects of embryo-maternal cross-talk in the bovine uterus. *Journal of Reproductive Immunology* **97** 20–26.
- Bauersachs S, Ulbrich SE, Gross K, Schmidt SEM, Meyer HHD, Einspanier R, Wenigerkind H, Vermehren M, Blum H, Sinowatz F et al.** (2005) Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: Detection of molecular pathways involved in functional changes. *Journal of Molecular Endocrinology* **34** 889–908.
- Bauersachs S, Ulbrich SE, Gross K, Schmidt SEM, Meyer HHD, Wenigerkind H, Vermehren M, Sinowatz F, Blum H and Wolf E** (2006) Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction* **132** 319–331.
- Bauersachs S, Simintiras CA, Sturmey RG, Krebs S, Bick J, Blum H, Wolf E, Lonergan P and Forde N** (2017) Effect of metabolic status on conceptus-maternal interactions on Day 19 in dairy cattle: II. Effects on the endometrial transcriptome. *Biology of Reproduction*.
- Bazer FW, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC and Bayless K** (2009) Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Molecular Human Reproduction* **16** 135–152.
- Bazer FW, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC and Bayless K** (2010) Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Molecular Human Reproduction* **16** 135–152.
- Bazer FW, Wu G, Johnson GA, Kim J and Song G** (2011) Uterine histotroph and conceptus development: select nutrients and secreted phosphoprotein 1 affect mechanistic target of rapamycin cell signaling in ewes. *Biology of Reproduction* **85** 1094–1107.
- Bazer FW, Kim J, Ka H, Johnson GA, Wu G and Song G** (2012) Select nutrients in the uterine lumen of sheep and pigs affect conceptus development. *The Journal of Reproduction and Development* **58** 180–188.
- Bellessort B, Bachelot A, Heude É, Alfama G, Fontaine A, Le Cardinal M, Treier M and Levi G** (2014) Role of Foxl2 in uterine maturation and function. *Human Molecular Genetics* **24**

3092–3103.

- Bellessort B, Le Cardinal M, Bachelot A, Narboux-Nême N, Garagnani P, Pirazzini C, Barbieri O, Mastracci L, Jonchere V, Duvernois-Berthet E et al.** (2016) Dlx5 and Dlx6 control uterine adenogenesis during post-natal maturation: Possible consequences for endometriosis. *Human Molecular Genetics* **25** 97–108.
- Benayoun BA, Caburet S, Dipietromaria A, Bailly-Bechet M, Batista F, Fellous M, Vaiman D and Veitia RA** (2008) The identification and characterization of a FOXL2 response element provides insights into the pathogenesis of mutant alleles. *Human Molecular Genetics* **17** 3118–3127.
- Benayoun BA, Batista F, Auer J, Dipietromaria A, L'Hôte D, De Baere E and Veitia RA** (2009) Positive and negative feedback regulates the transcription factor FOXL2 in response to cell stress: evidence for a regulatory imbalance induced by disease-causing mutations. *Human Molecular Genetics* **18** 632–644.
- Benayoun BA, Georges AB, L'Hôte D, Andersson N, Dipietromaria A, Todeschini A-LL, Caburet S, Bazin C, Anttonen M, Veitia RA et al.** (2011) Transcription factor FOXL2 protects granulosa cells from stress and delays cell cycle: role of its regulation by the SIRT1 deacetylase. *Human Molecular Genetics* **20** 1673–1686.
- Bernardo GM and Keri RA** (2012) FOXA1: a transcription factor with parallel functions in development and cancer. *Bioscience Reports* **32** 113–130.
- Beysen D, Raes J, Leroy BPP, Lucassen A, Yates JRWRW, Clayton-Smith J, Ilyina H, Brooks SSS, Christin-Maitre S, Fellous M et al.** (2005) Deletions involving long-range conserved nongenic sequences upstream and downstream of FOXL2 as a novel disease-causing mechanism in blepharophimosis syndrome. *American Journal of Human Genetics* **77** 205–218.
- Beysen D, De Paepe A and De Baere E** (2009) FOXL2 mutations and genomic rearrangements in BPES. *Human Mutation* **30** 158–169.
- Blount AL, Schmidt K, Justice NJ, Vale WW, Fischer WH and Bilezikjian LM** (2009) FoxL2 and Smad3 coordinately regulate follistatin gene transcription. *Journal of Biological Chemistry* **284** 7631–7645.
- Boichard D** (1988) Impact économique d'une mauvaise fertilité chez la vache laitière. *INRA Productions Animales* **1** 245–252.
- Borghese B, Mondon F, Noël J-C, Fayt I, Mignot T-M, Vaiman D and Chapron C** (2008) Gene expression profile for ectopic versus eutopic endometrium provides new insights into endometriosis oncogenic potential. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* **22** 2557–2562.
- Bouhali K, Dipietromaria A, Fontaine A, Caburet S, Barbieri O, Bellessort B, Fellous M, Veitia RA and Levi G** (2011) Allelic reduction of Dlx5 and Dlx6 results in early follicular depletion: A new mouse model of primary ovarian insufficiency. *Human Molecular Genetics* **20** 2642–2650.
- Bouilly J, Veitia RA and Binart N** (2014) NOBOX is a key FOXL2 partner involved in ovarian folliculogenesis. *Journal of Molecular Cell Biology* **6** 175–177.
- Boulanger L, Pannetier M, Gall L, Allais-Bonnet A, Elzaïat M, Le Bourhis D, Daniel N, Richard C, Cotinot C, Ghyselinck NB et al.** (2014) FOXL2 Is a Female Sex-Determining Gene in the Goat. *Current Biology* **24** 404–408.
- Brayman MJ, Julian J, Mulac-Jericevic B, Conneely OM, Edwards DP and Carson DD** (2006) Progesterone receptor isoforms A and B differentially regulate MUC1 expression in uterine epithelial cells. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* **20** 2278–2291.
- Bruyas** (1991) Cycle oestral et détection des chaleurs. *Dépêche Vétérinaire* **sup 19** 9–14.
- Butler WR** (1998) Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **81** 2533–2539.
- Butler WR** (2003a) Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science* **83** 211–218.
- Butler WR** (2003b) Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in post partum dairy cows. *Livestock Production Science* **83** 211–218.

- Buzzio OL, Lu Z, Miller CD, Unterman TG and Kim JJ** (2006) FOXO1A differentially regulates genes of decidualization. *Endocrinology* **147** 3870–3876.
- Carter AM** (2012) Evolution of Placental Function in Mammals: The Molecular Basis of Gas and Nutrient Transfer, Hormone Secretion, and Immune Responses. *Physiological Reviews* **92** 1543–1576.
- Carvalho AV, Reinaud P, Forde N, Healey GD, Eozenou C, Giraud-Delville C, Mansouri-Attia N, Gall L, Richard C, Lonergan P et al.** (2014) SOCS genes expression during physiological and perturbed implantation in bovine endometrium. *Reproduction* **148** 545–557.
- Castrillon DH** (2003) Suppression of Ovarian Follicle Activation in Mice by the Transcription Factor Foxo3a. *Science* **301** 215–218.
- Cerri RLA, Rutigliano HM, Chebel RC and Santos JEP** (2009) Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. *Reproduction* **137** 813–823.
- Cerri RLA, Thompson IM, Kim IH, Ealy AD, Hansen PJ, Staples CR, Li JL, Santos JEP and Thatcher WW** (2012) Effects of lactation and pregnancy on gene expression of endometrium of Holstein cows at day 17 of the estrous cycle or pregnancy. *Journal of Dairy Science* **95** 5657–5675.
- Chance B, Sies H and Boveris a** (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* **59** 527–605.
- Chanock SJ, el Benna J, Smith RM and Babior BM** (1994) The respiratory burst oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* **269** 24519–24522.
- Charpigny G, Reinaud P, Tamby JP, Creminon C, Martal J, Maclouf J and Guillomot M** (1997) Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology* **138** 2163–2171.
- Charpigny G, Reinaud P, Créminon C and Tamby J-P** (1999) Correlation of increased concentration of ovine endometrial cyclooxygenase 2 with the increase in PGE2 and PGD2 in the late luteal phase. *Journal of Reproduction and Fertility* **117** 315–324.
- Cocquet J, Pailhoux E and Jaubert F** (2002) Evolution and expression of FOXL2. *Journal of Medical Genetics* 916–921.
- Cocquet J, De Baere E, Gareil M, Pannetier M, Xia X, Fellous M and Veitia RA** (2003) Structure, evolution and expression of the FOXL2 transcription unit. *Cytogenetic and Genome Research* **101** 206–211.
- Cozler Y Le, Lollivier V, Lacasse P, Disenhaus C, Le Cozler Y, Lollivier V, Lacasse P and Disenhaus C** (2008) Rearing strategy and optimizing first-calving targets in dairy heifers: a review. *Animal* **2** 1393–1404.
- Le Cozler Y** (2013) Reproduction chez la génisse laitière. *Repromag* 12–23.
- Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S et al.** (2001) The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nature Genetics* **27** 159–166.
- Darwash AO, Lamming GE and Woolliams JA** (1999) The potential for identifying heritable endocrine parameters associated with fertility in post-partum dairy cows. *Animal Science* **68** 333–347.
- Demetrio DGB, Santos RM, Demetrio CGB and Vasconcelos JLM** (2007) Factors Affecting Conception Rates Following Artificial Insemination or Embryo Transfer in Lactating Holstein Cows. *Journal of Dairy Science* **90** 5073–5082.
- Demmers KJ, Derecka K and Flint A** (2001) Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction (Cambridge, England)* **121** 41–49.
- Diskin MG and Morris DG** (2008) Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reproduction in Domestic Animals* **43** 260–267.
- Diskin MG and Sreenan JM** (2000) Expression and detection of oestrus in cattle. *Reproduction, Nutrition, Development* **40** 481–491.
- Downey BR** (1980) Regulation of the estrous cycle in domestic animals-- a review. *Canadian Veterinary Journal* **21** 301–306.
- Drion P V, Ectors FJ, Hanzen C, Lonergan P and Beckers JF** (1996) Régulation de la croissance

- folliculaire et lutéale: 2. Ovulation, corps jaune et lutéolyse. *Le Point Vétérinaire* **28** 893–900.
- Ealy AD and Yang QE** (2009) Control of interferon-tau expression during early pregnancy in ruminants. *American Journal of Reproductive Immunology* **61** 95–106.
- Ellsworth BS, Burns AT, Escudero KW, Duval DL, Nelson SE and Clay CM** (2003) 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.
- Ellsworth BS, Egashira N, Haller JL, Butts DL, Cocquet J, Clay CM, Osamura RY and Camper SA** (2006) FOXL2 in the pituitary: molecular, genetic, and developmental analysis. *Mol Endocrinol* **20** 2796–2805.
- Elzaïat M, Jouneau L, Thépot D, Klopp C, Allais-Bonnet A, Cabau C, André M, Chaffaux S, Cribiu E-P, Pailhoux E et al.** (2014) High-Throughput Sequencing Analyses of XX Genital Ridges Lacking FOXL2 Reveal DMRT1 Up-Regulation Before SOX9 Expression During the Sex-Reversal Process in Goats 1. *Biology of Reproduction* **91** 153 1–14.
- Eozenou C, Carvalho A V., Forde N, Giraud-Delville C, Gall L, Lonergan P, Auguste A, Charpigny G, Richard C, Pannetier M et al.** (2012) FOXL2 Is Regulated During the Bovine Estrous Cycle and Its Expression in the Endometrium Is Independent of Conceptus-Derived Interferon Tau. *Biology of Reproduction* **87** 32–32.
- Evans ACO and Walsh SW** (2012) The physiology of multifactorial problems limiting the establishment of pregnancy in dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development* **24** 233–237.
- Farin CE, Imakawa K, Hansen 1 R, McDonnell JJ, Murphy CN, Farin PW and Roberts2 ' RM** (1990) Expression of Trophoblastic Interferon Genes in Sheep and Cattle1. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* **43** 210–218.
- Filant J, Zhou H and Spencer TE** (2012) Progesterone Inhibits Uterine Gland Development in the Neonatal Mouse Uterus1. *Biology of Reproduction* **86** 1–9.
- Flechon JE, Guillomot M, Charlier M, Flechon B and Martal J** (1986) Experimental studies on the elongation of the ewe blastocyst. *Reproduction, Nutrition, Developpement* **26** 1017–1024.
- Forde N, Carter F, Fair T, Crowe MA, Evans ACO, Spencer TE, Bazer FW, McBride R, Boland MP, O'Gaora P et al.** (2009) Progesterone-Regulated Changes in Endometrial Gene Expression Contribute to Advanced Conceptus Development in Cattle1. *Biology of Reproduction* **81** 784–794.
- Forde N, Carter F, Spencer TE, Bazer FW, Sandra O, Mansouri-Attia N, Okumu LA, McGettigan PA, Mehta JP, McBride R et al.** (2011) Conceptus-Induced Changes in the Endometrial Transcriptome: How Soon Does the Cow Know She Is Pregnant?1. *Biology of Reproduction* **85** 144–156.
- Forde N, O'Gorman A, Whelan H, Duffy P, O'Hara L, Kelly AK, Havlicek V, Besenfelder U, Brennan L and Lonergan P** (2015) Lactation-induced changes in metabolic status and follicular-fluid metabolomic profile in postpartum dairy cows. *Reproduction, Fertility and Development* **28** 1882–1892.
- Friedman JR and Kaestner KH** (2006) The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63** 2317–2328.
- Fujii J, Iuchi Y and Okada F** (2005) Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E* **3** 43.
- Gailly-Fabre E, Kerlan V and Christin-Maitre S** (2015) [Pregnancy-associated hormones and fetal-maternal relations]. *Annales D'endocrinologie* **76** S39-50.
- Garnsworthy PC, Lock A, Mann GE, Sinclair KD and Webb R** (2008) Nutrition, metabolism, and fertility in dairy cows: 2. Dietary fatty acids and ovarian function. *Journal of Dairy Science* **91** 3824–3833.
- Georges A, Benayoun BA, Marongiu M, Dipietromaria A, L'Hôte D, Todeschini AL, Auer J,**

- Crisponi L and Veitia RA** (2011) Sumoylation of the forkhead transcription factor FOXL2 promotes its stabilization/activation through transient recruitment to PML bodies. *PLoS ONE* **6**.
- Georges A, Auguste A, Bessi re L, Vanet A, Todeschini AL and Veitia RA** (2013a) FOXL2: A central transcription factor of the ovary. *Journal of Molecular Endocrinology* **52**.
- Georges A, Auguste A, Bessi re L, Vanet A, Todeschini AL and Veitia RA** (2013b) FOXL2: A central transcription factor of the ovary. *Journal of Molecular Endocrinology* **52** 1–37.
- Geraldo MT, Valente GT, Braz AS and Martins C** (2013) The discovery of Foxl2 paralogs in chondrichthyan, coelacanth and tetrapod genomes reveals an ancient duplication in vertebrates. *Heredity* **111** 57–65.
- Ghochani Y, Saini JK, Mellon PL and Thackray VG** (2012) FOXL2 is involved in the synergy between activin and progesterins on the follicle-stimulating hormone β -subunit promoter. *Endocrinology* **153** 2023–2033.
- Gilbert CL, Jenkins K and Wathes DC** (1991) Pulsatile release of oxytocin into the circulation of the ewe during oestrus, mating and the early luteal phase. *Journal of Reproduction and Fertility* **91** 337–346.
- Goddard PJ, Allen WE and Gerring EL** (1985) Genital tract pressures in mares. I. Normal pressures and the effect of physiological events. *Theriogenology* **23** 815–827.
- Gonzalez-Recio O, Ugarte E and Bach A** (2012) Trans-generational effect of maternal lactation during pregnancy: a Holstein cow model. *PloS One* **7** e51816.
- Governini L, Carrarelli P, Rocha ALL, Leo V De, Luddi A, Arcuri F, Piomboni P, Chapron C, Bilezikjian LM and Petraglia F** (2014) FOXL2 in human endometrium: hyperexpressed in endometriosis. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)* **21** 1249–1255.
- Gray CA, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW and Spencer TE** (2002) Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction* **124** 289–300.
- Gray CA, Abbey CA, Beremand PD, Choi Y, Farmer JL, Adelson DL, Thomas TL, Bazer FW and Spencer TE** (2006) Identification of Endometrial Genes Regulated by Early Pregnancy, Progesterone, and Interferon Tau in the Ovine Uterus. *Biology of Reproduction* **74** 383–394.
- Guillomot M** (1995) Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* **49** 39–51.
- Guillomot M** (2001) *L'implantation Du Blastocyste - La Reproduction Chez Les Mammifères et L'homme*.
- Guillomot M, Fl chon J-E and Wintenberger-Torres S** (1981) Conceptus attachment in the Ewe: an ultrastructural study. *Placenta* **2** 169–181.
- Gupta S, Agarwal A, Banerjee J and Alvarez JG** (2007) The Role of Oxidative Stress in Spontaneous Abortion and Recurrent Pregnancy Loss: A Systematic Review. *Obstetrical & Gynecological Survey* **62** 335–347.
- Gupta S, Aziz N, Sekhon L, Agarwal R, Mansour G, Li J and Agarwal A** (2009) Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Preeclampsia: A Systematic review. *Obstetrical & Gynecological Survey* **64** 750–759.
- Hannenhalli S and Kaestner KH** (2009) The evolution of Fox genes and their role in development and disease. *Nature Reviews Genetics* **10** 233–240.
- Hertig AT, Rock J and Adams EC** (1956) A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *American Journal of Anatomy* **98** 435–493.
- Ho YS, Gargano M, Cao J, Bronson RT, Heimler I and Hutz RJ** (1998) Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry* **273** 7765–7769.
- Hob  M, Lemercier G and S it  J.** (2008) Impact économique de la reproduction. *Journées Nationales GTV* pp 97-102.
- Horcajadas JA, Pellicer A and Simón C** (2007) Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: New times, new opportunities. *Human Reproduction Update* **13** 77–86.
- Hosaka T, Biggs WH, Tieu D, Boyer AD, Varki NM, Cavenee WK and Arden KC** (2004)

- Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** 2975–2980.
- Hue I, Degrelle SA and Turenne N** (2012) Conceptus elongation in cattle: Genes, models and questions. *Animal Reproduction Science* **134** 19–28.
- Igosheva N, Abramov AY, Poston L, Eckert JJ, Fleming TP, Duchen MR and McConnell J** (2010) Maternal Diet-Induced Obesity Alters Mitochondrial Activity and Redox Status in Mouse Oocytes and Zygotes. *PLOS ONE* **5** e10074.
- Ikeda Y, Shen WH, Ingraham H a and Parker KL** (1994) Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* **8** 654–662.
- Ireland JJ, Mihm M, Austin E, Diskin MG and Roche JF** (2000) Historical Perspective of Turnover of Dominant Follicles During the Bovine Estrous Cycle: Key Concepts, Studies, Advancements, and Terms. *J Dairy Sci* **83** 1648–1658.
- Jamieson S and Fuller PJ** (2012) Molecular pathogenesis of granulosa cell tumors of the ovary. *Endocrine Reviews* **33** 109–144.
- Jarvie E, Hauguel-de-Mouzon S, Nelson SM, Sattar N, Catalano PM and Freeman DJ** (2010) Lipotoxicity in obese pregnancy and its potential role in adverse pregnancy outcome and obesity in the offspring. *Clinical Science* **119** 123–129.
- Jegou V, Lan BLE, Guenic MLE, Trou G, Jouanne D, Tirard S, Cadoret P and Bras A** (2006) Evaluation de l'impact économique de la santé en élevage laitier - Enquêtes dans le réseau breton de fermes de référence ETRE Lait . Economic impact of health in dairy cattle - Surveys in dairy herds of Brittany. 22195.
- Justice NJ, Blount AL, Pelosi E, Schlessinger D, Vale W and Bilezikjian LM** (2011) Impaired FSHbeta expression in the pituitaries of Foxl2 mutant animals. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* **25** 1404–1415.
- Kashimada K, Svingen T, Feng C-W, Pelosi E, Bagheri-Fam S, Harley VR, Schlessinger D, Bowles J and Koopman P** (2011) Antagonistic regulation of Cyp26b1 by transcription factors SOX9/SF1 and FOXL2 during gonadal development in mice. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25** 3561–3569.
- Katoh M, Igarashi M, Fukuda H, Nakagama H and Katoh M** (2013) Cancer genetics and genomics of human FOX family genes. *Cancer Letters* **328** 198–206.
- Kim SY, Weiss J, Tong M, Laronda MM, Lee EJ and Jameson JL** (2009) Foxl2, a forkhead transcription factor, modulates nonclassical activity of the estrogen receptor- α . *Endocrinology* **150** 5085–5093.
- Klein C, Bauersachs S, Ulbrich SE, Einspanier R, Meyer HHD, Schmidt SEM, Reichenbach H-D, Vermehren M, Sinowatz F, Blum H et al.** (2006) Monozygotic Twin Model Reveals Novel Embryo-Induced Transcriptome Changes of Bovine Endometrium in the Preattachment Period1. *Biology of Reproduction* **74** 253–264.
- Kohan K, Carvajal R, Gabler F, Vantman D, Romero C and Vega M** (2010) Role of the transcriptional factors FOXO1 and PPARG on gene expression of SLC2A4 in endometrial tissue from women with polycystic ovary syndrome. *Reproduction* **140** 123–131.
- Kotilainen T, Huhtinen M and Katila T** (1994) Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology* **41** 629–636.
- Kuo FT, Bentsi-Barnes IK, Barlow GM, Bae J and Pisarska MD** (2009) Sumoylation of Forkhead L2 by Ubc9 is required for its activity as a transcriptional repressor of the Steroidogenic Acute Regulatory gene. *Cellular Signalling* **21** 1935–1944.
- Lacerte** (2003) *La Détection Des Chaleurs et Le Moment de L'insémination*.
- Laloraya M, Kumar GP and Laloraya MM** (1989) A possible role of superoxide anion radical in the process of blastocyst implantation in *Mus musculus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **161** 762–770.
- Langendijk P, Bouwman EG, Soede NM, Taverne MA and Kemp B** (2002) Myometrial activity around estrus in sows: spontaneous activity and effects of estrogens, cloprostenol, seminal plasma and clenbuterol. *Theriogenology* **57** 1563–1577.

- Le-Mezec P and Launay A** (2014) Le cheptel laitier français Évolution génétique et phénotypique 1993-2013 - Préviation d'évolution génétique 2013-2019. *Compte Rendu N° 0014200017* 1–40.
- Leung DTH, Fuller PJ and Chu S** (2016) Impact of FOXL2 mutations on signaling in ovarian granulosa cell tumors. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **72** 51–54.
- Lodé T** (2012) Oviparity or viviparity? That is the question... *Reproductive Biology* **12** 259–264.
- Loffler KA, Zarkower D and Koopman P** (2003) 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.
- Lydon JP, De Mayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Shyamala G, Conneely OM and O'Malley BW** (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes and Development* **9** 2266–2278.
- Lyimo ZC, Nielen M, Ouweltjes W, Kruip TA and van Eerdenburg FJ** (2000) Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. *Theriogenology* **53** 1783–1795.
- Macklon NS and Brosens JJ** (2014) The Human Endometrium as a Sensor of Embryo Quality. *Biology of Reproduction* **91** 1–8.
- Mann GE, Payne JH and Lamming GE** (2001) Hormonal regulation of oxytocin-induced prostaglandin F₂ secretion by the bovine and ovine uterus in vivo. *Domestic Animal Endocrinology* **21** 127–141.
- Mansouri-Attia N, Sandra O, Aubert J, Degrelle S, Everts RE, Giraud-Delville C, Heyman Y, Galio L, Hue I, Yang X et al.** (2009a) Endometrium as an early sensor of in vitro embryo manipulation technologies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** 5687–5692.
- Mansouri-Attia N, Aubert J, Reinaud P, Giraud-Delville C, Taghouti G, Galio L, Everts RE, Degrelle S, Richard C, Hue I et al.** (2009b) Gene expression profiles of bovine caruncular and intercaruncular endometrium at implantation. *Physiological Genomics* **39** 14–27.
- Mariens** (1993) La dynamique folliculaire chez les bovins. Apports du suivi échographique.
- Martal JL, Chêne NM, Huynh LP, L'Haridon RM, Reinaud PB, Guillomot MW, Charlier MA and Charpigny SY** (1998) IFN-tau: A novel subtype I IFN1. Structural characteristics, non-ubiquitous expression, structure-function relationships, a pregnancy hormonal embryonic signal and cross-species therapeutic potentialities. *Biochimie* **80** 755–777.
- Mattiske D, Kume T and Hogan BLM** (2006) The mouse forkhead gene Foxc1 is required for primordial germ cell migration and antral follicle development. *Developmental Biology* **290** 447–458.
- Mesquita FS, Ramos RS, Pugliesi G, Andrade SCS, Van Hoeck V, Langbeen A, Oliveira ML, Gonella-Diaza AM, Gasparin G, Fukumasu H et al.** (2015) The Receptive Endometrial Transcriptomic Signature Indicates an Earlier Shift from Proliferation to Metabolism at Early Diestrus in the Cow. *Biology of Reproduction* **93** 52.
- Le Mezec P** (2014) Fertilité des principales races laitières Bilan 1999-2012. 1: 42.
- Mitko K, Ulbrich SE, Wenigerkind H, Sinowatz F, Blum H, Wolf E and Bauersachs S** (2008) Dynamic changes in messenger RNA profiles of bovine endometrium during the oestrous cycle. *Reproduction* **135** 225–240.
- Morgan G, Wooding FB and Godkin JD** (1993) Localization of bovine trophoblast protein-1 in the cow blastocyst during implantation: an immunological cryoultrastructural study. *Placenta* **14** 641–649.
- Moumné L, Dipietromaria A, Batista F, Kocer A, Fellous M, Pailhoux E and Veitia RA** (2008a) Differential aggregation and functional impairment induced by polyalanine expansions in FOXL2, a transcription factor involved in cranio-facial and ovarian development. *Human Molecular Genetics* **17** 1010–1019.
- Moumné L, Batista F, Benayoun BA, Nallathambi J, Fellous M, Sundaresan P and Veitia RA** (2008b) The mutations and potential targets of the forkhead transcription factor FOXL2. *Molecular and Cellular Endocrinology* **282** 2–11.
- Mulac-Jericevic B** (2000) Subgroup of Reproductive Functions of Progesterone Mediated by

- Progesterone Receptor-B Isoform. *Science* **289** 1751–1754.
- Navot D, Scott RT, Droesch K, Veeck LL, Liu HC and Rosenwaks Z** (1991) The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. *Fertility and Sterility* **55** 114–118.
- Nef S and Vassalli J-D** (2009) Complementary pathways in mammalian female sex determination. *Journal of Biology* **8** 74.
- Nikolakopoulos E and Watson ED** (1997) Does artificial insemination with chilled, extended semen reduce the antigenic challenge to the mare's uterus compared with natural service? *Theriogenology* **47** 583–590.
- Norman HD, Wright JR, Hubbard SM, Miller RH and Hutchison JL** (2009) Reproductive status of Holstein and Jersey cows in the United States. *Journal of Dairy Science* **92** 3517–3528.
- Okano A and Okuda K** (1996) Oxytocin receptors in the myometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Anim Sci Technol* 102–103.
- Oliveira LJ, Barreto RSN, Perecin F, Mansouri-Attia N, Pereira FT V and Meirelles F V.** (2012) Modulation of maternal immune system during pregnancy in the cow. *Reproduction in Domestic Animals* **47** 384–393.
- Pailhoux E, Vigier B, Chaffaux S, Serval N, Taourit S, Furet JP, Fellous M, Grosclaude F, Cribiu EP, Cotinot C et al.** (2001) A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nature Genetics* **29** 453–458.
- Palacio JR, Iborra A, Ulcova-Gallova Z, Badia R and Martínez P** (2006) The presence of antibodies to oxidative modified proteins in serum from polycystic ovary syndrome patients. *Clinical and Experimental Immunology* **144** 217–222.
- Pannetier M, Fabre S, Batista F, Kocer A, Renault L, Jolivet G, Mandon-Pépin B, Cotinot C, Veitia R and Pailhoux E** (2006) FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: Towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *Journal of Molecular Endocrinology* **36** 399–413.
- Park M, Shin E, Won M, Kim J-H, Go H, Kim H-L, Ko J-J, Lee K and Bae J** (2010) FOXL2 interacts with steroidogenic factor-1 (SF-1) and represses SF-1-induced CYP17 transcription in granulosa cells. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* **24** 1024–1036.
- Perreault SD, Wolff RA and Zirkin BR** (1984) The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Developmental Biology* **101** 160–167.
- Petit G.** (1894) Nouvelle observation d'hermaphrodisme complexe des voies génitales chez un bouc. *Recueil de Médecine Vétérinaire, Ecole d'Alfort* 247–249.
- Pisarska MD, Bae J, Klein C and Hsueh AJW** (2004) Forkhead L2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. *Endocrinology* **145** 3424–3433.
- Pisarska MD, Barlow G and Kuo F-T** (2011) Minireview: roles of the forkhead transcription factor FOXL2 in granulosa cell biology and pathology. *Endocrinology* **152** 1199–1208.
- Ponsuksili S, Murani E, Schwerin M, Schellander K, Tesfaye D and Wimmers K** (2012) Gene expression and DNA-methylation of Bovine pretransfer endometrium depending on its receptivity after in vitro-produced embryo transfer. *PLoS ONE* **7**.
- Ribeiro ES, Santos JEP and Thatcher WW** (2016) Role of lipids on elongation of the preimplantation conceptus in ruminants. *Reproduction (Cambridge, England)* **152** R115-26.
- Robbins JR and Bakardjiev AI** (2012) Pathogens and the placental fortress. *Current Opinion in Microbiology* **15** 36–43.
- Roberts RM** (2007) Interferon-tau, a Type 1 interferon involved in maternal recognition of pregnancy. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **18** 403–408.
- Robledo RF, Rajan L, Li X and Lufkin T** (2002) The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes & Development* **16** 1089–1101.
- Roelofs J, Lopez-Gatius F, Hunter RHF, van Eerdenburg FJCM and Hanzen C** (2010) When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. *Theriogenology* **74** 327–344.
- Rowson LE and Moor RM** (1966) Embryo transfer in the sheep: the significance of synchronizing oestrus in the donor and recipient animal. *Journal of Reproduction and*

Fertility **11** 207–212.

- Sandra O, Mansouri-Attia N and Lea RG** (2011) Novel aspects of endometrial function: A biological sensor of embryo quality and driver of pregnancy success. *Reproduction, Fertility and Development* **24** 68–79.
- Sandra O, Constant F, Vitorino Carvalho A, Eoznou C, Valour D, Mauffr V, Hue I and Charpigny G** (2015) Maternal organism and embryo biosensing: Insights from ruminants. *Journal of Reproductive Immunology* **108** 105–113.
- Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens S a, Guenther JN, Parrish JJ and Wiltbank MC** (2002) Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science* **85** 2803–2812.
- Saumande** (1991) No Title. *Rec. Med. Vet.* 205–218.
- Schmidt D** (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* **131** 933–942.
- Schreck R and Baeuerle PA** (1991) A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends in Cell Biology* **1** 39–42.
- Seegers H, Malher X, Fourichon C, Bareille N and Beaudeau F** (1999) Effets économiques associés aux variations de performances de reproduction en troupeau laitier. *Méthodologie Des Problèmes D'infécondité Chez La Vache Laitière* pp 49-58.
- Shah SP, Köbel M, Senz J, Morin RD, Clarke BA, Wiegand KC, Leung G, Zayed A, Mehl E, Kalloger SE et al.** (2009) Mutation of FOXL2 in granulosa-cell tumors of the ovary. *The New England Journal of Medicine* **360** 2719–2729.
- Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S and Gilbert RO** (2006) Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* **65** 1516–1530.
- Sheldon IM, Cronin JG, Healey GD, Gabler C, Heuwieser W, Streyll D, Bromfield JJ, Miyamoto A, Fergani C and Dobson H** (2014) Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. *Reproduction (Cambridge, England)* **148** R41-51.
- Shimizu T, Krebs S, Bauersachs S, Blum H, Wolf E and Miyamoto A** (2010) Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine endometrium. *Physiological Genomics* **42A** 290–300.
- Shirozu T, Sasaki K, Kawahara M, Yanagawa Y, Nagano M, Yamauchi N and Takahashi M** (2016) Expression dynamics of bovine MX genes in the endometrium and placenta during early to mid pregnancy. *The Journal of Reproduction and Development* **62** 29–35.
- Snijders SEM, Dillon P, O'Callaghan D and Boland MP** (2000) Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows. *Theriogenology* **53** 981–989.
- Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW and Burghardt RC** (2004) Implantation mechanisms: Insights from the sheep. *Reproduction* **128** 657–668.
- Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC and Palmarini M** (2007) Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: Roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction, Fertility and Development* **19** 65–78.
- Spencer TE, Dunlap KA and Filant J** (2012) Comparative developmental biology of the uterus: Insights into mechanisms and developmental disruption. *Molecular and Cellular Endocrinology* **354** 34–53.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH and Schreiber RD** (1998) How cells respond to interferons. *Annual Review of Biochemistry* **67** 227–264.
- Stewart C a., Fisher SJ, Wang Y, Stewart MD, Hewitt SC, Rodriguez KF, Korach KS and Behringer RR** (2011) Uterine Gland Formation in Mice Is a Continuous Process, Requiring the Ovary after Puberty, But Not after Parturition. *Biology of Reproduction* **85** 954–964.
- Storey KB** (1996) Oxidative stress: Animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **29** 1715–1733.
- Suarez SS** (2014) *Gamete and Zygote Transport*.
- Sugino N, Shimamura K, Takiguchi S, Ono M, Nakata M, Nakamura Y, Uda T, Kato H,**

- Tamura H, Ono M *et al.*** (1996) Changes in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Hum Reprod* **11** 1073–1078.
- Takano M, Lu Z, Goto T, Fusi L, Higham J, Francis J, Withey A, Hardt J, Cloke B, Stavropoulou A V. *et al.*** (2007) Transcriptional Cross Talk between the Forkhead Transcription Factor Forkhead Box O1A and the Progesterone Receptor Coordinates Cell Cycle Regulation and Differentiation in Human Endometrial Stromal Cells. *Molecular Endocrinology* **21** 2334–2349.
- Takasawa K, Kashimada K, Pelosi E, Takagi M, Morio T, Asahara H, Schlessinger D, Mizutani S and Koopman P** (2014) FOXL2 transcriptionally represses Sf1 expression by antagonizing WT1 during ovarian development in mice. *FASEB Journal* **28** 2020–2028.
- Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA *et al.*** (2006) Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* **147** 1097–1121.
- Tan YF, Li FX, Piao YS, Sun XY and Wang YL** (2003) Global gene profiling analysis of mouse uterus during the oestrous cycle. *Reproduction* **126** 171–182.
- Thomas M, Jain S, Kumar GP and Laloraya M** (1997) A programmed oxyradical burst causes hatching of mouse blastocysts. *Journal of Cell Science* **110** (Pt 1 1597–1602.
- Thompson LP and Al-Hasan Y** (2012) Impact of oxidative stress in fetal programming. *Journal of Pregnancy* **2012**.
- Thompson IM, Cerri RLA, Kim IH, Ealy AD, Hansen PJ, Staples CR and Thatcher WW** (2012) Effects of lactation and pregnancy on metabolic and hormonal responses and expression of selected conceptus and endometrial genes of Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **95** 5645–5656.
- Tibbetts T a, Conneely OM and O'Malley BW** (1999) Progesterone via its receptor antagonizes the pro-inflammatory activity of estrogen in the mouse uterus. *Biology of Reproduction* **60** 1158–1165.
- Tran S, Zhou X, Lafleur C, Calderon MJ, Ellsworth BS, Kimmins S, Boehm U, Treier M, Boerboom D and Bernard DJ** (2013) Impaired Fertility and FSH Synthesis in Gonadotrope-Specific *Foxl2* Knockout Mice. *Molecular Endocrinology* **27** 407–421.
- Troccon JL and Petit M** (1989) Croissance des génisses et performances ultérieures. *INRA Productions Animales* **2** 55–64.
- Tu Z, Ran H, Zhang S, Xia G, Wang B and Wang H** (2014) Molecular determinants of uterine receptivity. *International Journal of Developmental Biology* **58** 147–154.
- Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D and Pilia G** (2004) Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Human Molecular Genetics* **13** 1171–1181.
- Uhlenhaut NH and Treier M** (2011) Forkhead transcription factors in ovarian function. *Reproduction (Cambridge, England)* 1–23.
- Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, Treier AC, Klugmann C, Klasen C, Holter NI *et al.*** (2009) Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation. *Cell* **139** 1130–1142.
- Vaiman D, Koutita O, Oustry A, Elsen JM, Manfredi E, Fellous M and Crihiu EP** (1996) Genetic mapping of the autosomal region involved in XX sex-reversal and horn development in goats. *Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society* **7** 133–137.
- Vaiman D, Schibler L, Oustry-Vaiman a, Pailhoux E, Goldammer T, Stevanovic M, Furet JP, Schwerin M, Cotinot C, Fellous M *et al.*** (1999) High-resolution human/goat comparative map of the goat polled/intersex syndrome (PIS): the human homologue is contained in a human YAC from HSA3q23. *Genomics* **56** 31–39.
- Vasconcelos JLM, Demétrio DGB, Santos RM, Chiari JR, Rodrigues CA and Filho OGS** (2006) Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology* **65** 192–200.

- Verdin H and De Baere E** (2012) FOXL2 impairment in human disease. *Hormone Research in Paediatrics* **77** 2–11.
- Victor VM, Rocha M, Bañuls C, Alvarez A, de Pablo C, Sanchez-Serrano M, Gomez M and Hernandez-Mijares A** (2011) Induction of oxidative stress and human leukocyte/endothelial cell interactions in polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **96** 3115–3122.
- Walker CG, Meier S, Littlejohn MD, Lehnert K, Roche JR and Mitchell MD** (2010) Modulation of the maternal immune system by the pre-implantation embryo. *BMC Genomics* **11** 1–13.
- Wang Y, Goldberg J, Sharma RK, Agarwal A and Falcone T** (1997) Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility. *Fertility and Sterility* **68** 826–830.
- Wang J, Ray PS, Sim M-S, Zhou XZ, Lu KP, Lee A V, Lin X, Bagaria SP, Giuliano AE and Cui X** (2012) FOXC1 regulates the functions of human basal-like breast cancer cells by activating NF- κ B signaling. *Oncogene* **31** 4798–4802.
- Wathes DC** (2012) Mechanisms linking metabolic status and disease with reproductive outcome in the dairy cow. *Reproduction in Domestic Animals* **47** 304–312.
- Wathes DC, Fenwick M, Cheng Z, Bourne N, Llewellyn S, Morris DG, Kenny D, Murphy J and Fitzpatrick R** (2007) Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology* **68**.
- Wathes DC, Cheng Z, Chowdhury W, Fenwick MA, Fitzpatrick R, Morris DG, Patton J, Murphy JJ, De W, Cheng Z et al.** (2009) Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. *The American Physiological Society* **39** 1–13.
- Watson ED, Nikolakopoulos E, Gilbert C and Goode J** (1999) Oxytocin in the semen and gonads of the stallion. *Theriogenology* **51** 855–865.
- Weigel D, Jürgens G, Küttner F, Seifert E and Jäckle H** (1989) The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the Drosophila embryo. *Cell* **57** 645–658.
- Wooding FB** (1982) The role of the binucleate cell in ruminant placental structure. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* **31** 31–39.
- Xu D, Wang B, Xu Y, Chen Z, Cui Q, Yang Y, Chen H and Kong MG** (2016) Intracellular ROS mediates gas plasma-facilitated cellular transfection in 2D and 3D cultures. *Scientific Reports* **6** 27872.
- Yano A, Guyomard R, Nicol B, Jouanno E, Quillet E, Klopp C, Cabau C, Bouchez O, Fostier A and Guiguen Y** (2012) An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology* **22** 1423–1428.
- Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D and Arav A** (2001) Seasonal changes in bovine fertility: Relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction* **121** 447–454.
- Zlotogora J, Sagi M and Cohen T** (1983) The Blepharophimosis, Ptosis, and Epicanthus Inversus Syndrome: Delineation of Two Types. *Am J Hum Genet* **35** 1020–1027.

ANNEXES

1. Annexes

a- **Gènes cibles putatifs de FOXL2 dans l'endomètre bovin.** La liste des gènes a été obtenue par comparaison *in silico* des profils transcriptomiques de l'endomètre bovin (Mansouri-Attia *et al.*, 2009) et des gènes cibles de *FOXL2* dans les cellules KGN (Batista *et al.*, 2007) ; Thèse C. Eozenou

GENE	GENE INFORMATION
ABLIM2	Actin Binding LIM Protein Family, Member 2
ALS2CL	ALS2 C-Terminal Like
ANKRD12	ankyrin repeat domain 12
ASB2	Ankyrin Repeat And SOCS Box Containing 2
ATF3	activating transcription factor 3
C1orf78	C1orf78
CCND2	Cyclin D2
CHRM2	Cholinergic Receptor, Muscarinic 2
CLDN4	Claudin 4
CXCL10	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 10
CXCL12	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 12
DLX1	Distal-Less Homeobox 1
ENPP1	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1
FOS	FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog
FZD3	Frizzled Family Receptor 3
GDF6	Growth Differentiation Factor 6
GDF8	Growth Differentiation Factor 8
GPRC5B	G Protein-Coupled Receptor, Family C, Group 5, Member B
HES1	Hairy And Enhancer Of Split 1
IL6R	Interleukin 6 Receptor
JUP	Junction Plakoglobin
KCNE3	Potassium Voltage-Gated Channel, Isk-Related Family, Member 3
KLF5	Kruppel-Like Factor 5
LOC387763	Chromosome 11 Open Reading Frame 96
LOC441698	Ras-related protein Rap-2c-like (<i>Homo Sapiens</i>)
MGP	Matrix Gla Protein
PREX1	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphate-Dependent Rac Exchange Factor 1
PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 (Prostaglandin G/H Synthase And Cyclooxygenase)
RGS2	Regulator Of G-Protein Signaling 2
RRAD	Ras-Related Associated With Diabetes
SCARA5	Scavenger Receptor Class A, Member 5
SELL	Selectin L
SESN2	Sestrin 2
SMPX	Small Muscle Protein, X-Linked
SOD2	Superoxide Dismutase 2
TGFB2	Transforming Growth Factor, Beta 2
TNFAIP3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
TMEM88	Transmembrane Protein 88

b- Protocole : Rétro transcription (RT) et PCR quantitative (qPCR)

Les ARN totaux sont extraits par lyse des cellules dans du Trizol (Life Technologies) comme publié précédemment (Mansouri-Attia *et al.*, 2009). Les échantillons sont purifiés sur colonne Qiagen avec une étape de traitement à la DNase (RNeasy mini kit; Qiagen). La quantité d'ARN ainsi que leur intégrité et pureté ont été analysés par Bioanalyzer Agilent 2100 (plateforme @BRIDGE-ICE, INRA Jouy-en-Josas). Les ARN totaux sont stockés à -80°C avant l'analyse.

500 ng d'ARN totaux purifiés sont rétrotranscrits en ADNc par l'enzyme Maxima (Thermo Fisher Scientific) dans 20 µl. La réaction de RT-qPCR est réalisée avec le Master mix SYBR Green et le système Step One Plus (Applied Biosystem). Les primers (Eurogentec) ont été dessinés avec Primer express (logiciel version 3.0, Applied Biosystem) afin d'amplifier spécifiquement les gènes de ménage (*C2ORF29*, *GAPDH*, *RPL19*, *SLC30A6*, *SUZ12*) et les gènes d'intérêt.

c- Table des primers des gènes de ménage utilisés en RT-qPCR

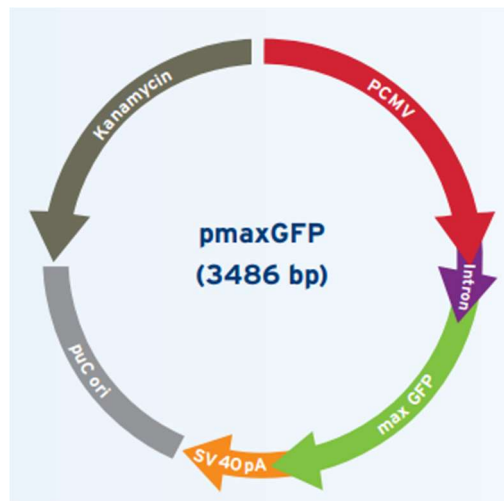
Gene symbol	Gene description	Sequence (5' → 3')	Tm (°C)	Amplicon size (bp)
RPL19	Ribosomal protein L19	Forward: CCCCAATGAGACCAATGAAATC	57	73
		Reverse: CAGCCCATCTTTGATCAGCTT	59	
ATF3	Activating transcription factor 3	Forward: TGCGGGCCCTCTATTGC	60	65
		Reverse: GCTGGACTCGTGTGTTCTGCTT	64	
FOXL2	Forkhead box protein L2	Forward: CCGGCATCTACCAGTACATTATAGC	61	101
		Reverse: GCACTCGTTGAGGCTGAGGT	62	
RGS2	Regulator of G-protein signaling 2	Forward: CTGAATTCAGCCTGGGTGTTTC	60	110
		Reverse: CTGCCCCAGTACCAGCTTCT	62	
RSAD2	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2	Forward: ACTGGACCTGGCTTTTCTGIGA	61	99
		Reverse: ACGTTGCCCTAGATTACATCCTTAT	60	
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	Forward: GGATGTCACCAGGACGTTAATG	60	90
		Reverse: GAGCCACTGGAGCTGAGGTT	62	

d- Protocole : Immunocytochimie

Les cellules endométriales sont cultivées sur lamelles stériles de 12 mm et fixées en PAF 4% pendant 10 min à température ambiante puis rincées en PBS avec Ca²⁺ et Mg²⁺. Les lamelles sont incubées en tampon citrate (sodium citrate 0,01M ; pH 6) 5 min à température ambiante puis 10 min à 80°C. L'activité peroxydase endogène des cellules est inactivée par un traitement d'H₂O₂ à 0,01% (Sigma-Aldrich). Les cellules sont incubées toute la nuit à 4°C en présence de l'anticorps dirigé contre FOXL2 produit chez le lapin (dilution 1:250 ; Eozenou *et al.*, 2012) en tampon phosphate (0,1M ; pH 7,4 + 2% BSA et 1% Normal Donkey Serum). Après rinçage en tampon phosphate (0,1M ; pH 7,4 + 2%

BSA), les cellules sont incubées avec l'anticorps anti-IgG de lapin produit chez la chèvre (dilution 1:1000, Ab6720, Abcam) pendant 1h à température ambiante. Les lamelles sont lavées en tampon phosphate + 2% BSA et incubées 1h avec le kit ABC Vector (Vectastain Elite ABC kit, Vector Labs) en tampon Tris (Tris 50 mM + NaCl 1,15M et pH 7,5). Elles sont rincées puis incubées 5 min avec du Diaminobenzidine-Nickel en tampon Tris. Les lames sont montées avec le milieu Eukitt (Sigma-Aldrich). Les images ont été prises avec le Nanozoomer Digital Pathology System et analysées avec le logiciel NDP View (Nanozoomer Digital Pathology Virtual Slide software, Hamamatsu).

e- Carte du plasmide GFPmax (Lonza). Plasmide contenant la protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein) du copépode *Pontellina p.*



f- Protocole de transfection par lipofection

Le protocole de lipofection avec le Xtreme Gene (Roche) est le même que celui de la plupart des lipofectants. Dans un premier temps, le plasmide ADN est dilué à la concentration voulue dans de l'OptiMEM (Sigma-Aldrich). Le lipofectant est ensuite ajouté au plasmide en prenant soin de ne pas toucher les parois du tube. Les complexes plasmide-lipofectant sont formés pendant 15 min à température ambiante. Ils sont alors ajoutés au goutte à goutte. Les cellules sont incubées 24h à 38°C et 5% de CO₂ avant l'analyse.

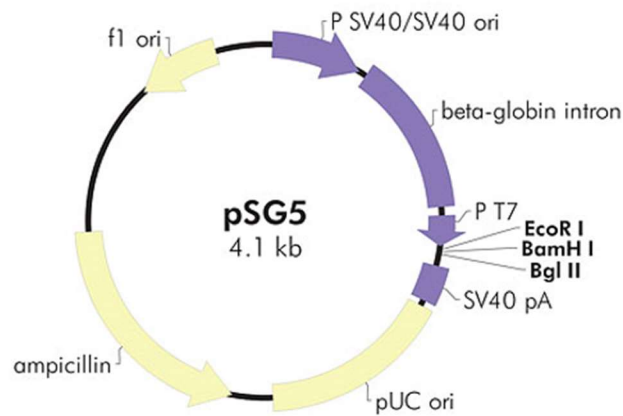
g- Protocole de transfection par électroporation

Les fibroblastes sont transfectés avec le kit Lonza Amaxa™ Basic Nucleofector pour cultures primaires de cellules stromales. Les cellules épithéliales glandulaires sont transfectés avec le kit Lonza Amaxa™ Basic Nucleofector pour cultures primaires de cellules épithéliales de mammifères. Les cellules sont dans un premier temps décollées de leur support par trypsination douce (TrypLE Express, Gibco). Elles sont quantifiées par spectrométrie à 490 nm. Environ 10^6 de cellules sont aliquotées et centrifugées à 90 g pendant 10 min à température ambiante. Le culot de cellules est ressuspendu lentement dans 100 μ l de tampon Nucleofector à température ambiante. Deux μ g de plasmide sont ajoutés à la suspension cellulaire puis celle-ci est transférée dans une cuvette d'électroporation. La cuvette est insérée dans l'électroporateur Amaxa (Lonza) et le programme sélectionné est lancé. Une fois le programme terminé, 500 μ l de milieu de culture complet à 38°C sont ajoutés dans la cuvette d'électroporation. Les cellules sont immédiatement transférées dans des boîtes de cultures en milieu complet et incubées à 38°C et 5% de CO₂ pendant 24h.

h- Protocole de transfection par magnétofection

Les cellules sont déprivées en antibiotique 24h avant la transfection. La transfection est réalisée en puits de culture de diamètre 22 mm. Pour chaque puit, le plasmide est préparé dans 100 μ l de DMEM-F12 (1,6 μ g pour les fibroblastes et 3,2 μ g pour les cellules EG) et la lipofectamine (Invitrogen) est diluée à part dans 100 μ l de DMEM-F12 (4 μ l pour les fibroblastes et 6,4 μ l pour les cellules EG). Les solutions de plasmide et de lipofectant sont poolées et incubées 5 min à 38°C. Ensuite nous ajoutons 1,6 μ l de suspension de nanoparticules magnétiques (CombiMag, OzBiosciences) et homogénéisons doucement à la pipette. La préparation est incubée 20 min à 38°C puis distribuée sur les cellules au goutte à goutte. Le milieu est homogénéisé. Les cellules sont incubées 20 min à 38°C et 5% de CO₂ sur la plaque magnétique puis laissées 24h à 38°C et 5% de CO₂.

i- Carte du plasmide pSG5. Le gène *FOXL2* caprin y est inséré en utilisant les sites de restriction BamH1 (<http://www.genomics.agilent.com>)



Feature	Nucleotide Position
SV40 promoter and SV40 origin of replication	28-366
β -globin intron	395-967
T7 promoter	1022-1040
EcoR I	1043
BamH I	1049
Bgl II	1055
SV40 polyA signal	1069-1202
pUC origin of replication	1342-2009
ampicillin resistance (<i>bla</i>) ORF	2160-3017
f1 origin of ss-DNA replication	3587-3893

j- Séquence du gène *FOXL2* caprin intégré au plasmide pSG5. Rouge : séquence du gène *FOXL2* caprin ; Vert : primers pour l'amplification du cadre de lecture de *FOXL2* lors du clonage du plasmide pSG5 ; Bleu : site de restriction BamH1 utilisé pour l'intégration du gène *FOXL2* dans le plasmide pSG5 ; Jaune : domaine de liaison à l'ADN du gène *FOXL2* (d'après M. Pannetier).

AAGAGCGCAGAAAAGAAAACCCACCGAGGCGGGGACTGGCCTGGGCGGGGAGGGGCGGCGGAGCTGGA
 GCCCCTCTCTGTTGGGCGGACTCCCCATGGCCAGAGGCTAAGCTCCACTCCCGCCGGCCGCTCCCTTG
 GGAAGGGAAAGAAGAGGAGAGAGGAGCGAGAGGCCGCCAGCAAGAGCGCGGGCGGCATCCGCGAGTC
 TGCAGAAGTTTGGAGACTCGGCCGTGAACGGACTTGTGCGCCCGGATTCTTTGCGGCGCCAGCGGAAAA
 GAGCAGGGACTG**CCCGGCCGCGGCGCGCCGGC**TTTGT**CATGATGGCCAGCTACCCCGAGCCCGAGGAC**
GCCTCGGGGGCCCTGCTGGCCCCGGAGACCGCCGCGCAGCCAAGGAGCCCGAGGCGCCGGCGCCGCC
CAGCCCGGGCAAGGGCGGCGGCGGGTGCGGGGG**CAGCCCGGAGAAGCCGGACCCGGCGCAGAAGC**
CCCCATACTCTTATGTGGCGCTCATCGCCATGGCGATCCGCGAGAGCGCCGAGAAGAGGCTCACGCTG
TCCGGCATCTACCAGTACATTATAGCCAAGTTCCCGTTCTACGAGAAGAACAAGAAGGGCTGGCAGAA
TAGCATCCGCCACAACCTCAGCCTCAACGAGTGCTTCATCAAGGTGCCGCGCAGGGCGGCGGCGAGC
GCAAGGGCAACTACTGGACGCTGGACCCGGCCTGCGAGGACATGTTTCGAGAAGGGCAACTACCGGCGC
CGCCCGCCGATGAAGCGGCCTTCCGGCCACCGCCGCGCACTTCCAGCCCGCAAGGGGCTCTTTGG
 GGCAGGAGGCGCTGCGGGTGGCTGCGGGTGGCGGGAGCAGGGGACAGCGGTACGGCTACCTGGCGC
 CCCCCAAGTACCTGCAGTCCGGCTTCTCAACAACCTCGTGGCCGCTACCGCAGCCGCCCTTCGCCCATG
 CCCTACGCCTCCTGCCAGATGGCGGCCCGCCGCGCGGGCTGCGGCGGCCGCGGCAGCCGCGGGCCC
 GGGCAGCCCTGGCGCGGCCCGGGTGGTCAAGGGGCTGGCGGGCCCGCCGCTCGTACGGGCCGTA
 CGCGCGTGCAAAGCATGGCGCTGCCTCCCGGCTAGTGAACCTGTAACCGGTCTGGGAGGCCCTCC
 GCCGCGCTCCGCCGCCGCTCACCCCACTCACCCCGCACGCACACCATCTGCACGCGGCCGCCGC
 TCCCCCGCCGGCCCTCCGACACCGGGCCCGCGCCGCCCGCCCGGGCCAGCTCAGCCAGCCAGTC
 CGGCCACTGCCGCGCCCCCGCGCCCGCCACCAACGCACCCGGCCTGCAGTTCGCCTGCGCCCGG
 CAGCCCGAGCTCGCCATGATGCATTGCTCTTACTGGGACCACGACAGCAAGACCGGCGCGCTGCACTC
 GCGCCTCGATCTCTGAGAGTGCAGCGCATGAAGGCTGCGAGGATGCAG**GGATCC**GCGACGCCCGCCTT
 GGCCGAGCAGCCGGCCAGA**CCGCGCGCCCGCTGGGGCC**CCTGAGCCAGCGCCACCGCCCTCTGC
 GCCTCCTCGCACTCCTCGGCTCCTCTTGCTCCTCTTTGTCTCCGCTTCTCCCCGTGTTGCGCTCCCTG
 CCCTCTTTGCCCTTTGCTCCTCTGGCCTGCAGGCCGCTCTCCACGCTTTTCCGAGGCCCTAGCCT
 TCTCCGGCACCTCAGCGTCCGGGCTAGACACCCGTCGCCAAAATTCACGGCGGAGAGGAAGTGCCG
 GGGCCGAGGTGCAGCCGGGCTTCGGCTGCGCAGACCTCCTGGCCTTTTCTCACAGGTCCGTGCACTCG
 CACTCGGCCCTCCGCCGGGCTGCCGCGCCATCCTTGGCTAGAAGCGCCGGCATGGGCCGGCAACAAGA
 CCCGCGCCGCCGAGAAAGGGACAAACGGATGTTTGTCCGCGTACCCTTTTGGAGCTATTCAGAAGC
 CCCTTCTGGGGCCACTGGGCAGGGCGGGATGGGCTGGATCAGGGAGCCGGGTCTGCCTCGCTCG
 GCGGCCTGTACCCGGGTTTACAATAGCATCCCGGCTCGGAGAGAGACTGCGTTTTCTCCGCTCTCCAT
 CCCGGCGCTTGGGGCCCTTCAGGCACGGGCGGCTGGCTCATGTTTTGCTAAAAAGATCACGAGGGCT
 ATTTTAGATAATATAAAAAAATAATTTTTTAAAGGAAAAAATTCACCGGAAAACCGGCGAAGTATT
 GTGGCCTTGGAGTTTGTCTAAAGCAAAACATGAAAACTTTTTGCAGGAGATTTGAAGAATTCCTGTCCG
 GCCTTCAGAAAGCTATGTTTCAGAGAGGTAGGAGTATATGCCAGTATCAGATGGTTTTCTTTACAAT
 TAGAGCATTTACCCCTCAACCTATCTTTTTTTTAAAGTCGAAAACAAATTTCCCCCTATCTTCCGA
 TGCCAGCCCTGAGCGGGGAGATCACTGTCTGCCTGGCCGAAGCTGCAGGGTCTCTCATTCCTCCCT
 GATTTTTGTTTTTCAAACGTCTTGCTTCTCCCACTTTGGACAAGAGAAATGTGAAACCCGGCAGCAGT
 CGGACCAGGCGGGCTTGTGGCTCCGAGCCTACCGGCCACGACTCTAGACCTGGTTGTTTTGTAGTGT
 GTCGTTCCGAGGACCAAATTTTTCTAGAAAAGAACTAGAGCACTTTTGTCTTTTTGTTGTTTGT
 GTTGTGTTTTGTCTTGTC AATTCTCGAATAAA

2. Communications orales

GDR Repro 2015, Rennes (France)

FOXL2 is a new progesterone-regulated gene in the endometrium

Audrey Lesage-Padilla^{1*}, Caroline Eozenou^{1*}, Gareth Healey², Takashi Shimizu³, Jean-François Oudin¹, Daniel Vaiman⁴, Akio Myamoto³, I Martin Sheldon², Pierrette Renaud¹, Gilles Charpigny¹, Maëlle Pannetier¹, Olivier Sandra¹

1 INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy-en-Josas, France

2 Centre for Reproductive Immunology, Swansea University, Swansea, UK

3 Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Hokkaido, Japan

4 Institut Cochin, INSERM U1016, Paris, France

* co-first authors; audrey.lesage@jouy.inra.fr

In mammals, mutual actions of estrogens and progesterone on their uterine receptors are essential for endometrium receptivity and conceptus implantation. In cattle we showed that *FOXL2* -a key gene for ovarian differentiation and maintenance- is expressed and regulated in endometrium during oestrous cycle, a finding confirmed in murine and human endometrium. The present study aims to determine if *FOXL2* is a progesterone-target gene in the bovine endometrium. Using various experimental models in cattle, our results indicated (i) a negative correlation between *FOXL2* gene expression and progesterone (P4) blood levels (ii) a significant reduction of *FOXL2* transcript level in ovariectomized cows supplemented with P4 for 6 days (2.2-fold vs. control ovariectomized cows, $P < 0.05$) (iii) a significant decrease in *FOXL2* mRNA level in bovine endometrial explants incubated with P4 (10^{-5} M) for 48h (2.4-fold vs. control explants, $P < 0.05$). No impact of oestradiol on *FOXL2* gene expression was detected in these conditions. In order to confirm the regulation of *FOXL2* promoter by P4, COS7 cells were transfected with a caprine *FOXL2* reporter gene and progesterone receptor (PR) A or B expression vectors. In the presence of PRA and PRB, P4 (10^{-7} M) stimulated the activity of *FOXL2* promoter (2.8-fold). Mutation of the P4 Response Element (PRE) in the caprine *FOXL2* promoter abrogated the activity of this promoter in P4-treated COS7 cells overexpressing PRA/PRB. Collectively, our data show that reduced *FOXL2* expression in the endometrium during the luteal phase results from the down-regulation of PRA/B known to occur in the presence of P4. Determining the biological actions of *FOXL2* will be mandatory to define the contribution of this transcription factor in the regulation of sensor and driver properties of the endometrium.

Supported by ANR-08-GENM-037, INRA PHASE division and MESR

ICAR 2016, Tours (France)

Maternal metabolism affects endometrial *FOXL2* gene expression at implantation in dairy cattle

Audrey Lesage-Padilla¹, Mélanie Poirée¹, Niamh Forde², Corinne Giraud-Delville¹, Olivier Desnoes³, Pascal Salvetti³, Pat Lonergan², Gilles Charpigny¹, Olivier Sandra¹

¹ UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350, Jouy en Josas, France

² School of Agriculture and Food Science, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland

³ Allice, Station de phénotypage, Le Perroi, 37380 Nouzilly, France

In high-producing dairy cattle, reproductive efficiency is low as a consequence of intensive selection for increased milk production. This sub-fertility is associated with pregnancy failures that mainly occur during the first month of pregnancy [1]. In addition, pre-conceptional status of pregnant females has been reported to affect progeny performance after birth [2]. Whilst a relationship between intensive milk production and oocyte quality as well as embryo development has been established [3, 4], few analyses have examined endometrium-conceptus interactions at the initiation of implantation, a critical milestone in pregnancy. The present study aimed to investigate the impact of a contrasted maternal metabolism on endometrium physiology at implantation. Primiparous Holstein-Friesian dairy cows were dried immediately after parturition (DRY group) or milked twice daily (LACT group). Between day 65 and 75 post-partum, oestrous cycle was synchronized and a single embryo derived from superovulated Holstein-Friesian heifers was transferred to each cyclic female at Day 7 post-oestrus. After slaughter at Day 19 post-oestrus, concepti were recovered from pregnant females (DRY, n=8; LACT, n=5) and endometrial caruncular (CAR) and intercaruncular areas (ICAR) were dissected from the uterine horn ipsilateral to the corpus luteum. Using total RNA and real-time PCR, we analysed the expression of a selection of endometrial genes known to be regulated by the presence of the conceptus (*PLET1*, *SOCS6*) and by interferon tau (*STAT1*, *RSAD2*, *SOCS1*, *SOCS3*) or involved in progesterone (*FOXL2*, *SCARA5*) prostaglandin (*PTGS2*) and oxidative stress (*CAT*, *SOD1*, *SOD2*) molecular pathways. Statistical analyses were run using SYSTAT software. Variance analyses revealed a significant impact of the maternal metabolic status on *FOXL2* ($P < 0.002$; DRY/LACT fold-ratio=2.1 in CAR and ICAR) and *SOD2* ($P < 0.04$; DRY/LACT fold-ratio=0.8 in CAR and ICAR) mRNA expression. *SOD2* transcript levels were increased in pregnant endometrium compared to non-pregnant heifers after embryo transfer (fold-ratio = 2.47 and 3.45 in CAR and ICAR respectively, $P < 0.01$). Collectively, our findings prompt the need for deciphering the contribution of *FOXL2* to endometrial physiology in the context of contrasting metabolic status in dairy cows.

[1] Diskin MG, Morris DG. Embryonic and early foetal losses incattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim* 2008; 43 (Suppl. 2),260-267.

[2] González-Recio O, Ugarte E, Bach A. Trans-generational effect of maternal lactation during pregnancy: a Holstein cow model. *PLoS One* 2012,7(12):e51816.

[3] Valour D et al. Dairy cattle reproduction is a tightly regulated genetic process: Highlights on genes, pathways, and biological processes. *Animal Frontiers* 2015, 5(1), 32-41.

3. Posters

GDR Repro 2015, Rennes (France)



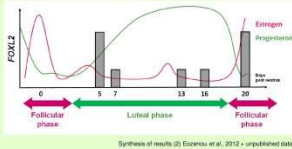
FOXL2 is a new progesterone-regulated gene in the endometrium

A. Lesage-Padilla^{1,2*}, C. Eozenou^{1,2*}, G. Healey³, T. Shimizu⁴, JF. Oudin^{1,2}, D. Vaiman⁵, A. Myamoto⁴, I. M. Sheldon⁵, P. Renaud^{1,2}, G. Charpigny^{1,2}, M. Pannetier^{1,2}, O. Sandra^{1,2}

¹ INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy-en-Josas, France; ² Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, (ENVA), France;

³ Centre for Reproductive Immunology, Swansea, UK; ⁴ Obihiro University of Agriculture and Vet Medicine, Hokkaido, Japan; ⁵ Institut Cochin, INSERM U1016, Paris, France; * co-first authors

SCIENTIFIC CONTEXT



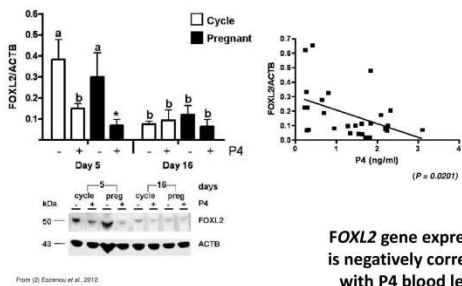
In mammals, **uterine receptivity** is a mandatory step prior to implantation and requires coordinated actions of estrogens (E2) and progesterone (P4) through their uterine cognate receptors (1). Recently our team showed that **FOXL2 - a key transcription factor for ovarian differentiation and maintenance - was expressed and regulated in bovine endometrium** during early pregnancy and oestrous cycle (2), a finding confirmed in mouse and human (3, 4). Our analyses also showed a **correlation between FOXL2 gene expression and progesterone (P4) circulating levels**, prompting the need to investigate if FOXL2 is a direct progesterone-target gene in endometrium.

Using bovine endometrial cells or tissues collected from experimental models, our results show (i) a negative correlation between endometrial FOXL2 gene expression and P4 blood levels, (ii) a significant decrease of endometrial FOXL2 mRNA level in ovariectomized cows supplemented with P4 or in bovine endometrial explants incubated with P4 (10⁻⁵ M) for 48h. Eventually, in the presence of nuclear P4 receptors A and B (PRA and PRB), P4 (10⁻⁷ M) stimulates the activity of FOXL2 promoter.

RESULTS

Endometrial FOXL2 expression in P4 supplemented heifers

Cyclic and pregnant heifers received +/- P4-releasing intravaginal device on day 3 post oestrus for 2 or 13 days

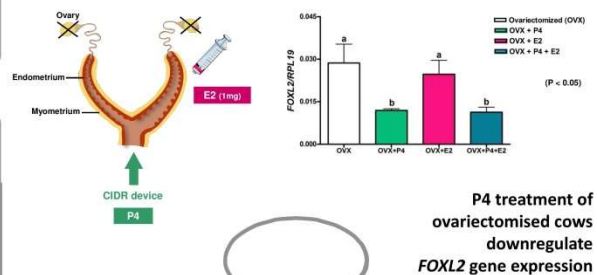


FOXL2 gene expression is negatively correlated with P4 blood levels

EXPERIMENT 1: in vivo

FOXL2 transcript level in ovariectomized cows supplemented with ovarian steroids

Holstein cows were ovariectomized and supplemented with E2 and/or P4 (n=3) (5) Shimizu et al., 2010

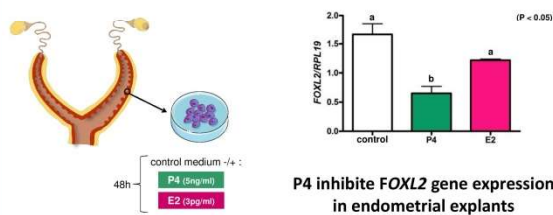


P4 treatment of ovariectomized cows downregulate FOXL2 gene expression

EXPERIMENT 2: ex vivo

FOXL2 transcript level in endometrial explants cultured with ovarian steroids

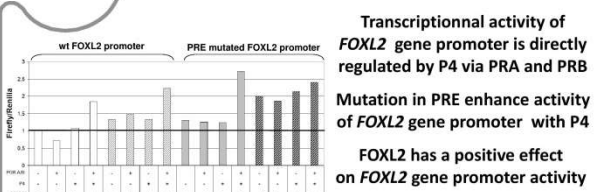
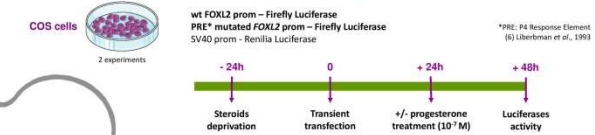
Endometrial explants were dissected from cows in late oestrus stage (n=2) and cultured for 48h with E2 and/or P4



P4 inhibit FOXL2 gene expression in endometrial explants

EXPERIMENT 3: in vitro

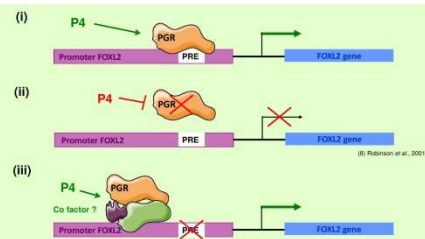
Regulation of FOXL2 promoter activity by P4 via its nuclear receptors



Transcriptional activity of FOXL2 gene promoter is directly regulated by P4 via PRA and PRB
Mutation in PRE enhance activity of FOXL2 gene promoter with P4
FOXL2 has a positive effect on FOXL2 gene promoter activity

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Our data have shown that **FOXL2 gene expression is negatively affected by P4**, a result consistent with microarray data reported for human endometrium across menstrual cycle (7). (i) Investigation in COS cells has demonstrated the **direct regulation of FOXL2 promoter activity by P4 in the presence of PRA and -B**. Our results provide a first insight about the decrease in FOXL2 gene expression determined in endometrial cells during the luteal phase of oestrous cycle. Indeed, during luteal phase, (ii) **high level of P4 inhibits endometrial PR expression** (a pre-requisite for successful implantation; 8), that accounts for the **decrease in FOXL2 RNA and protein expression**. Mutation in PRE of FOXL2 promoter underlines an enhancing action of P4 on FOXL2 gene promoter activity that does not involved nuclear binding of PRA/B. Determining co-factors involved in FOXL2 gene regulation as well as biological actions of this transcription factor will be critical to define the contribution of FOXL2 in regulating endometrial physiology in normal and pathological situations.



(1) Kowalik et al., 2013, *Reprod Biol* 13(1):15-23
(2) Eozenou et al., 2012, *Biol Reprod* 87(4):102
(3) Bellesort et al., 2015, *Hum Mol Genet*
(4) GEO profiles: GDS2052 / 2201102_xm / FOXL2

(5) Shimizu et al., 2010, *Physiol Genomics* 42A(4):290-300
(6) Liberberman et al., 1993, *Mol Endocrinol* Apr;7(4):515-27
(7) Tabii et al., 2006, *Endocrinology* 147(3):1097-1121
(8) Robinson et al., 2009, *Reproduction* 132(6):965-79

Email: audrey.lesage@jouy.inra.fr
Work was supported by INRA-PHASE Department and ANR MEETAC

Journée de l'école doctorale 2015 (1er prix poster, Section Reproduction)



Fonctions biologiques de FOXL2 dans l'endomètre bovin : un gène clé de l'axe reproducteur femelle

A. Lesage-Padilla^{1,2}, P. Reynaud^{1,2}, C. Richard¹, M. Delessard^{1,2}, M. Raliou^{1,2}, C. Giraud Delville^{1,2}, M. Poirée^{1,2}, L. Jouneau¹, F. Piumi¹, L. Gallo^{1,2}, G. Charpigny^{1,2}, O. Sandra^{1,2}

¹ INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy-en-Josas, France; ² Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, (ENVA), France

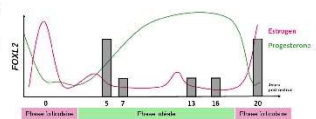
CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Les facteurs de transcription de la famille FOX jouent un rôle crucial dans la fonction reproductive femelle. **FOXL2** est exprimé chez un grand nombre d'espèces animales (Geraldo *et al.*, 2013) et jusqu'en 2012 son expression et ses fonctions semblaient restreintes à trois tissus spécifiques, à savoir la **formation des paupières fœtales** (Uda *et al.*, 2004), la **mise en place de la fonction gonadotrope dans l'antéhypophyse** (Ellsworth *et al.*, 2006) et la **mise en place et le maintien de la fonction ovarienne** (Schmidt *et al.*, 2004).

Les travaux pionniers menés au laboratoire ont révélé l'**expression et la régulation de l'expression de FOXL2 dans l'endomètre au cours du cycle oestral** chez le bovin (Mansouri-Attia *et al.*, 2009; Eozenou *et al.*, 2012). Un modèle murin de KO conditionnel dans l'endomètre a également montré que **FOXL2 est indispensable à la différenciation et la maturation post natales de l'utérus** (Bellessort *et al.*, 2015). Au vu de ces résultats, **notre hypothèse est que FOXL2 contribue à la régulation de la physiologie endométriale chez la femelle pubère**.

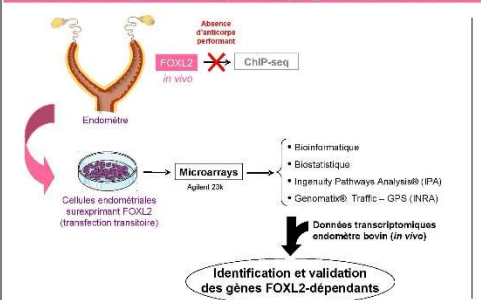
Après avoir démontré que la **régulation de l'expression de FOXL2 implique la progesterone et ses récepteurs nucléaires** (Eozenou *et al.*, in prep), mon objectif est d'identifier les gènes cibles et les fonctions biologiques régulées par **FOXL2** dans l'endomètre par des approches de génomique fonctionnelle incluant la **surespression de FOXL2 par transfection transitoire dans des cultures primaires de cellules endométriales bovines**. Les données obtenues serviront de base pour estimer l'implication de **FOXL2** dans le fonctionnement de l'endomètre dans des situations de fertilité normale ou perturbée.

Expression de FOXL2 dans l'endomètre bovin au cours du cycle oestral

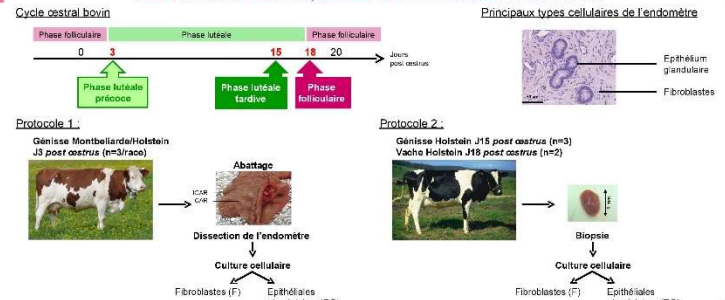


PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Identification des gènes cibles de FOXL2 par génomique fonctionnelle

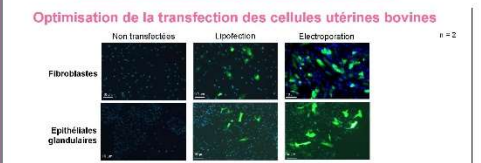


Etablissement de cultures primaires de cellules endométriales bovines



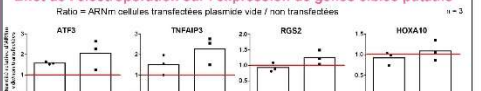
RESULTATS

Surespression de FOXL2 dans les cellules issues d'utérus prélevés à 3 jpo



➤ Transfection par électroporation mais faible taux dans les EG

Effet de l'électroporation sur l'expression de gènes cibles putatifs



➤ Effet «transfection» sur l'expression des gènes cibles putatifs

➤ Masquage de l'effet de la surexpression de FOXL2 ?

Effet de FOXL2 sur l'expression de gènes cibles putatifs

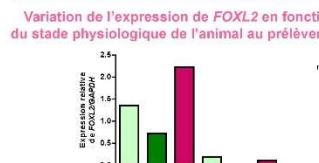


➤ Effet de FOXL2 sur les gènes cibles putatifs dans les fibroblastes

➤ Prélèvement à une autre phase du cycle ?

➤ Amélioration du taux de transfection ?

Comparaison des cultures primaires de cellules endométriales bovines

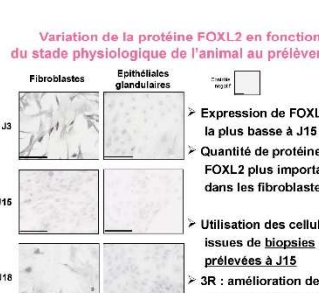


➤ Expression de FOXL2 la plus basse à J15

➤ Variation selon le profil d'expression du cycle oestral

= « mémoire » épigénétique des cellules

Variation de la protéine FOXL2 en fonction du stade physiologique de l'animal au prélèvement



➤ Expression de FOXL2 la plus basse à J15

➤ Quantité de protéine FOXL2 plus importante dans les fibroblastes

➤ Utilisation des cellules issues de biopsies prélevées à J15

➤ 3R : amélioration de l'expérimentation animale

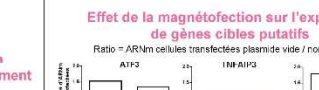
Surespression de FOXL2 dans les cellules issues de biopsies prélevées à 3 jpo



➤ Amélioration du taux de transfection en F et EG

➤ Réduction de la toxicité

Effet de la magnétolectroporation sur l'expression de gènes cibles putatifs



➤ Diminution de l'effet «transfection» sur l'expression des gènes cibles putatifs

... suite du projet

➤ Validation de l'effet de FOXL2 sur les gènes cibles putatifs par RT-qPCR

➤ Analyse transcriptomique par Microarrays

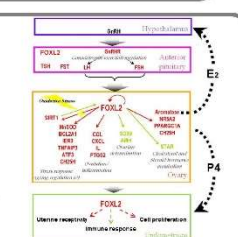
Puce bovine optimisée 23K, Agilent

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

L'un des objectifs de ma thèse vise à **identifier les gènes cibles de FOXL2 dans l'endomètre bovin afin de comprendre son implication dans la régulation de la physiologie endométriale chez l'adulte**. En l'absence d'anticorps performant pour réaliser une Immunoprécipitation de la chromatine à partir de tissu endométrial bovin, nous avons choisi une approche fonctionnelle s'appuyant sur la **surespression transitoire de FOXL2** en cultures primaires de cellules endométriales d'origine stromale ou glandulaire.

L'obtention du matériel biologique se faisait jusqu'à présent par abattage des animaux et prélèvement de l'utérus. La disponibilité des animaux ainsi que le coût rendait cette approche délicate et les premières analyses à 3 jpo ne montraient pas réponse à la surexpression de FOXL2 dans les EG. Le développement d'un protocole de **cultures primaires à partir de biopsies endométriales** a permis l'obtention de cellules à moindre frais tout en gardant l'animal en vie.

Les analyses des différentes cultures primaires a mis en évidence une « **mémoire** » des cellules en rapport avec le **stade physiologique de l'animal à partir duquel la biopsie a été prélevée**. Notre travail a permis (i) d'identifier le stade physiologique pertinent pour dériver le modèle *in vitro* de cultures primaires de cellules endométriales bovines (F et EG) (ii) de valider une technique de transfection qui permettra d'identifier les gènes cibles de FOXL2 par surexpression transitoire de ce facteur et analyses de l'impact de cette surexpression par microarrays bovins. Ces résultats permettront de comprendre la contribution de FOXL2 dans la régulation de la physiologie endométriale dans des situations physiologiques ou pathologiques de troubles de la fertilité.



Email: audrey.lesage@jouy.inra.fr

Financements: INRA-Département PHASE, projets européens FP7 KBBE FECUND et PROLIFIC

ICAR 2016, Tours (France)



Maternal metabolism affects endometrial FOXL2 gene expression at implantation in dairy cattle

A. Lesage-Padilla¹, M. Poirée¹, N. Forde², C. Giraud-Delville¹, P. Renaud¹, O. Desnoes³, P. Salvetti³, P. Lonergan², G. Charpigny¹, O. Sandra¹

¹ UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350, Jouy en Josas, France; ² School of Agriculture and Food Science, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland

³ Alice, Station de phénotypage, Le Perroi, 37380 Nouzilly, France

Email: audrey.lesage@jouy.inra.fr

SCIENTIFIC CONTEXT

In high-producing dairy cattle, reproductive efficiency is low as a consequence of **intensive selection for increased milk production**. This sub-fertility is associated with pregnancy failures that mainly occur during the first month of pregnancy (Diskin *et al.*, 2008). In addition, pre-conceptional status of pregnant females has been reported to **affect progeny performance after birth** (González-Reco *et al.*, 2012). Whilst a relationship between intensive milk production and oocyte quality as well as embryo development has been established (Valour *et al.*, 2015), few analyses have examined **endometrium-conceptus interactions** at the initiation of implantation, a critical milestone in pregnancy.

The present study aimed to investigate the **impact of a contrasted maternal metabolism on endometrium physiology at implantation**. Using total RNA and real-time PCR, we analysed the expression of a selection of endometrial genes:

- **Regulated by interferon tau (IFNT)**
STAT1, SOCS1, SOCS3 (Vitorino Carvalho *et al.*, 2014)
RSAD2 (Mansouri-Attia *et al.*, 2009)
- **Regulated by the presence of the conceptus but IFNT-independent**
PLET1 (Mansouri-Attia *et al.*, 2009), SOCS6 (Vitorino Carvalho *et al.*, 2014)
- **Involved in progesterone (P4) pathway**
FOXL2 (Eozenou *et al.*, 2012), SCARAS5 (Vitorino Carvalho *et al.*, unpublished)
PTGS2 (Charpigny *et al.*, 1997)
- **Involved in oxidative stress molecular pathway**
CAT, SOD1, SOD2 (Al-Gubory *et al.*, 2008)

EXPERIMENTAL DESIGN

Metabolic model

In vivo embryos produced by artificial insemination (AI) in heifers and collected by flushing

Single embryo transfer

Calving -65/75 Synchronization 0 7 Slaughter 19 Days post ovulation (dpo)

Lactating Holstein cows LACT n=5/11 pregnant
Dry Holstein cows DRY n=8/10 pregnant
Holstein heifers HEIF n=4/6 pregnant

Dissection of endometrium from pregnant animals (ipsi lateral horn)

RT-qPCR
Western Blot

Non pregnant / Pregnant heifers

Synchronization AI Slaughter 19 dpo

Pregnant Holstein heifers Preg n=11/16
Non pregnant Holstein heifers Non Preg n= 5/16

Dissection of endometrium (ipsi lateral horn)

RT-qPCR

RESULTS

Impact of maternal metabolism on endometrial gene expression

IFNT-dependent genes

No significant effect of metabolism on IFNT-dependent gene expression

Conceptus-dependent / IFNT-independent genes

No significant effect of metabolism on expression of conceptus-dependent gene

P4-dependent genes

Significant \uparrow of FOXL2 expression in ICAR tissue of DRY cows
No significant effect of metabolism on PTGS2 and SCARAS5 expression

Oxidative stress pathway

Significant \downarrow of Catalase and SOD1 expression in ICAR tissue of DRY cows
Significant effect of metabolism on SOD2 between LACT and DRY cows

Impact of maternal metabolism on FOXL2 protein level

Significant \uparrow of FOXL2 protein level on ICAR tissue of DRY cows

Impact of metabolism on P4 blood level and correlation with FOXL2 expression

No significant effect of metabolism on P4 blood level at 19 dpo
No correlation between FOXL2 expression and P4 blood level at 19 dpo

Principal Component Analysis of endometrial transcripts (metabolic model)

CAR Biplot (axes F1 and F2 : 60.58 %)
ICAR Biplot (axes F1 and F2 : 55.56 %)

CAT and SOD1 mRNA expressions are highly correlated in both tissue
FOXL2 and SOD2 mRNA expressions are negatively correlated in ICAR tissue
Axis F1 discriminates DRY cows from LACT and HEIF cows in ICAR PCA

Impact of conceptus on endometrial gene expression

Significant \uparrow of SOD2 expression
Significant \downarrow of FOXL2 expression in CAR and ICAR tissue when conceptus is present

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

- Maternal metabolism affects conceptus-endometrial interactions in early pregnant dairy cows
 - Physiological status of DRY cows differ from that of heifers, with a major impact on FOXL2 gene expression in the pregnant ICAR endometrium
- Endometrial CAR and ICAR areas are differentially impacted by maternal metabolism
 - Is it related to differences in tissue cell populations (e.g. presence of endometrial glands in ICAR areas)?
- FOXL2 expression is not correlated with P4 blood level in pregnant cattle when implantation initiates
 - Which factor(s) regulate(s) FOXL2 expression during early pregnancy?
- Is SOD2 a target gene of FOXL2 in bovine endometrium?
 - Will need to be assessed using an *in vitro* model of primary cultures of bovine endometrial cells

Fundings: INRA-Department PHASE, ED419 Biosigne, European Union Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 under grant agreement n° 312097 ('FECUND')

Impact of a contrasted metabolism on endometrial and peripheral signaling pathways at implantation in dairy cattle

A. Lesage-Padilla¹, V. Mauffré¹, M. Poirée¹, N. Forde², C. Giraud-Delville¹, P. Renaud¹, C. Eozenou¹, P. Lonergan², G. Charpigny¹, O. Sandra¹

¹UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350, Jouy en Josas, France; ²School of Agriculture and Food Science, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland

SCIENTIFIC CONTEXT

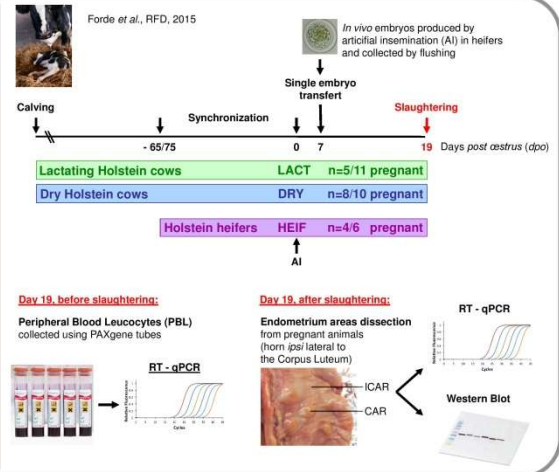
Intensive selection for milk production has led to a reduced reproduction efficiency of high-producing dairy cattle. The first month of pregnancy is associated to a high rate of pregnancy failures (Diskin et al., 2008). In addition to embryo losses, pre-conceptual status of pregnant females has been reported to affect progeny performance after birth (González-Reico et al., 2012). Whilst a relationship between intensive milk production and oocyte quality as well as embryo development has been established (Valour et al., 2015), few analyses have targeted the maternal organism by investigating the local (endometrium) and peripheral (Peripheral Blood Leucocytes, PBL) reaction of the female to the presence of the conceptus at the initiation of implantation, a critical milestone in pregnancy.

The present study aimed to investigate the impact of the conceptus on the endometrial physiology and on PBL in a bovine model of contrasted maternal metabolism at implantation (Forde et al., 2015).

In the experimental model, expression of the following genes was analyzed:

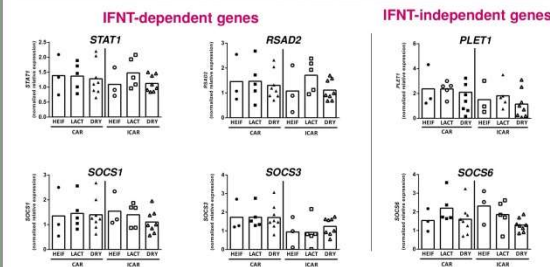
- Regulated by the conceptus and Interferon tau (IFNT) dependent
STAT1, SOCS1, SOCS3 (Vitorino Carvalho et al., 2014)
RSAD2 (Mansouri-Attia et al., 2009)
- Regulated by the conceptus but IFNT-independent
PLET1 (Mansouri-Attia et al., 2009), SOCS6 (Vitorino Carvalho et al., 2014)
- Progesterone (P4)-dependent genes
PTGS2 (Charpigny et al. 1997), SCARA5 (Mitko et al., 2008; Vitorino Carvalho et al., in prep)
FOXL2 (Eozenou et al., 2012)
- Involved in regulation of oxidative stress pathway
CAT, SOD1, SOD2 (Al-Gubory et al., 2008)

EXPERIMENTAL DESIGN



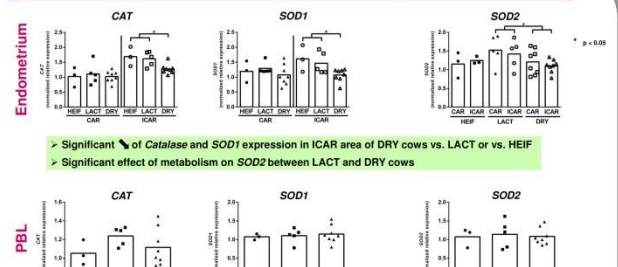
RESULTS

Conceptus-dependent gene expression



No significant effect of metabolism on expression of conceptus-dependent gene

Oxidative stress pathway

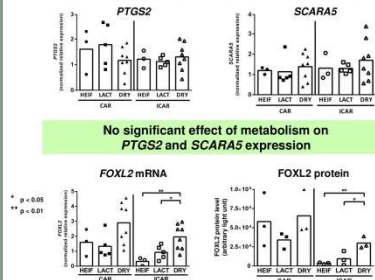


Significant \downarrow of Catalase and SOD1 expression in ICAR area of DRY cows vs. LACT or vs. HEIF

Significant effect of metabolism on SOD2 between LACT and DRY cows

No significant effect of metabolism on oxidative stress enzymes expression in PBL

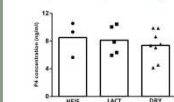
Progesterone-dependent genes



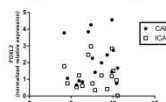
No significant effect of metabolism on PTGS2 and SCARA5 expression

Significant \uparrow of FOXL2 expression (mRNA and protein) in ICAR areas of DRY cows vs. LACT or vs. HEIF

P4 blood level at day 19

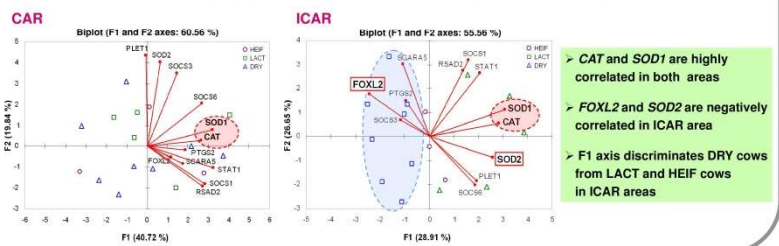


P4 / FOXL2 correlation



- No significant effect of metabolism on P4 blood level at 19 dpo
- No significant correlation between FOXL2 mRNA expression and P4 blood level at 19 dpo

Principal Component Analysis of endometrial transcripts



CAT and SOD1 are highly correlated in both areas

FOXL2 and SOD2 are negatively correlated in ICAR area

F1 axis discriminates DRY cows from LACT and HEIF cows in ICAR areas

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

- Variation of maternal metabolism affects the expression of CAT, SOD1, SOD2 and FOXL2 in DRY cows at day 19 of pregnancy
→ Physiological status of DRY cows differ from that of heifers, with a major impact on FOXL2 gene expression in the pregnant ICAR endometrium
- ICAR areas are more sensitive to variations of maternal metabolism than CAR
→ Are variations in gene expression take place in endometrial glands?
→ Is histotrophe production modified?
→ Does it affect conceptus development?
- FOXL2 expression is increased in DRY cows independently from P4 blood level
→ Which factor(s) regulate(s) FOXL2 expression during early pregnancy?
- Is SOD2 a FOXL2 target gene in bovine endometrium as previously reported in Human granulosa carcinoma KGN cells (Batista et al., 2007)?
→ To be assessed using an *in vitro* model of primary cultures of bovine endometrial cells

4. Publications supplémentaires

Analysis of *STAT1* expression and biological activity reveals interferon-tau-dependent *STAT1*-regulated SOCS genes in the bovine endometrium

A. Vitorino Carvalho, C. Eozenou, G. D. Healey, N. Forde, P. Reinaud, M. Chebrou, L. Gall, N. Rodde, A. Lesage-Padilla, C. Giraud Delville, M. Leveugle, C. Richard, I. M. Sheldon, P. Lonergan, G. Jolivet and O. Sandra

Reproduction, Fertility and Development, 2016 Mar;28(4):459-74.
doi: 10.1071/RD14034.

Analysis of STAT1 expression and biological activity reveals interferon-tau-dependent STAT1-regulated SOCS genes in the bovine endometrium

A. Vitorino Carvalho^A, C. Eozenou^A, G. D. Healey^B, N. Forde^C, P. Reinaud^A, M. Chebrouit^A, L. Gall^A, N. Rodde^D, A. Lesage Padilla^A, C. Giraud Delville^A, M. Leveugle^E, C. Richard^A, I. M. Sheldon^B, P. Lonergan^C, G. Jolivet^A and O. Sandra^{A,F}

^AINRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350 Jouy-en-Josas, France.

^BCentre for Reproductive Immunology, Institute of Life Science, College of Medicine, Swansea University, Swansea, SA2 8PP, UK.

^CSchool of Agriculture and Food Science, University College Dublin, Dublin, Ireland.

^DINRA, UPRI258 Centre National des Ressources Génétiques Végétales, F-31326 Castanet Tolosan, France.

^EINRA, UR1077 Unité Mathématique Informatique et Génome, Jouy-en-Josas, France.

^FCorresponding author. Email: olivier.sandra@jouy.inra.fr

Abstract. Signal transducer and activator of transcription (STAT) proteins are critical for the regulation of numerous biological processes. In cattle, microarray analyses identified *STAT1* as a differentially expressed gene in the endometrium during the peri-implantation period. To gain new insights about *STAT1* during the oestrous cycle and early pregnancy, we investigated *STAT1* transcript and protein expression, as well as its biological activity in bovine tissue and cells of endometrial origin. Pregnancy increased *STAT1* expression on Day 16, and protein and phosphorylation levels on Day 20. In cyclic and pregnant females, STAT1 was located in endometrial cells but not in the luminal epithelium at Day 20 of pregnancy. The expression of *STAT1* during the oestrous cycle was not affected by progesterone supplementation. *In vivo* and *in vitro*, interferon-tau (IFNT) stimulated *STAT1* mRNA expression, protein tyrosine phosphorylation and nuclear translocation. Using chromatin immunoprecipitation in IFNT-stimulated endometrial cells, we demonstrated an increase of STAT1 binding on interferon regulatory factor 1 (*IRF1*), cytokine-inducible SH2-containing protein (*CISH*), suppressor of cytokine signaling 1 and 3 (*SOCS1*, *SOCS3*) gene promoters consistent with the induction of their transcripts. Our data provide novel molecular insights into the biological functions of STAT1 in the various cells composing the endometrium during maternal pregnancy recognition and implantation.

Additional keywords: cattle, chromatin immunoprecipitation, implantation, transcription factor, uterus.

Received 30 January 2014, accepted 12 July 2014, published online 13 August 2014

Introduction

In mammals, implantation represents a crucial step of pregnancy, the success of which relies on tightly regulated interactions between the growing embryo and the receptive endometrium (Lee and DeMayo 2004). Through its bio-sensing and bio-driving properties, the endometrium plays a critical role in the progression of implantation in various species including ruminants (Spencer *et al.* 2007; Sandra *et al.* 2012). In cattle, large-scale changes in endometrial gene expression at various stages of the oestrous cycle and early pregnancy (before implantation, which occurs around 20 days after oestrus) have been investigated using microarrays and RNA-sequencing analyses (Klein *et al.* 2006; Bauersachs *et al.* 2009, 2012; Mansouri-Attia *et al.*

2009a, 2009b; Walker *et al.* 2010; Forde *et al.* 2011a, 2011b, 2012; Mamo *et al.* 2012). The expression of numerous genes has been shown to be altered by the presence of the conceptus as early as Day 15 after oestrus (Forde *et al.* 2011b; Bauersachs *et al.* 2012) but also by interferon-tau (IFNT), a cytokine secreted by trophoblast cells and considered as the major signal of maternal recognition of pregnancy in ruminants (Ealy and Yang 2009). Based on transcriptome profiles, various families of transcription factors have been shown to be expressed in the endometrium, including several members of the winged-helix–forkhead domain (eg. *FOXL2*; Eozenou *et al.* 2012) and the signal transducer and activators of transcription (*STAT*) genes (Klein *et al.* 2006; Bauersachs *et al.* 2009, 2012;

Mansouri-Attia *et al.* 2009a, 2009b; Walker *et al.* 2010; Forde *et al.* 2011a, 2011b, 2012; Mamo *et al.* 2012).

The STAT proteins represent a family of transcription factors known to be essential for cell proliferation, differentiation and apoptosis (Levy and Darnell 2002; Ivashkiv and Hu 2004). In mammalian cells, the STAT family is composed of seven members transcribed from different genes: *Stat1*, -2, -3, -4, -5A, -5B and -6. Upon phosphorylation by the Janus kinases (JAK), STAT proteins dimerise and translocate to the nucleus, where they bind specific motifs of DNA in order to regulate the transcription of their target genes (Stark *et al.* 1998). A wealth of STAT target genes have been identified in various cell models and species, including the suppressor of cytokine signalling (SOCS) proteins that are involved in the negative regulation of the JAK-STAT pathway (cytokine-inducible SH2-containing protein (CISH) and SOCS1 to SOCS7; Rico-Bautista *et al.* 2006; Yoshimura *et al.* 2007).

In the endometrium of humans and mice, *Stat3* and *Stat5* genes have been shown to have significant biological functions during early pregnancy (Maj and Chelmonska-Soyta 2007). Murine *Stat3* has been described in the luminal epithelial cells at implantation (4–5 days post-coitum) and in the decidual cells from 7 to 9 days post-coitum (Teng *et al.* 2004). Phosphorylation of murine STAT3 is induced by embryo implantation (Teng *et al.* 2004) and the inhibition of STAT3 activity is associated with implantation failure due to the absence of stromal cell decidualisation (Catalano *et al.* 2005; Nakamura *et al.* 2006). In humans, the level of phosphorylated STAT3 appears to be abnormally low in the endometrium of some patients with unexplained infertility (Dimitriadis *et al.* 2007). In the case of *Stat5*, several studies have highlighted the involvement of prolactin (PRL)-activated STAT5 in the regulation of glandular epithelium development and uterine secretions in humans and mice (Mak *et al.* 2002; Nagashima *et al.* 2008; Bednorz *et al.* 2011; Ji *et al.* 2011). Taken together, these data demonstrate that STAT3 and STAT5 take part in the regulation of uterine physiology in species displaying an invasive implantation.

In ruminants, reports have described a highly specific mechanism involving IFNT and the STAT1 signalling pathways during gestation until implantation. *In vitro* analyses of cultured ovine or bovine epithelial endometrial cells and human STAT1-deficient fibrosarcoma cells have shown that STAT1 phosphorylation represents a major step of the IFNT intracellular signalling pathway (Binelli *et al.* 2001; Stewart *et al.* 2001, 2002; Kim *et al.* 2003; Forde *et al.* 2011a). A model has been proposed, in which STAT1 tyrosine phosphorylation elicited by IFNT leads to the formation of STAT1 homodimers as well as a STAT1-STAT2-interferon responsive factor 9 (IRF9) heterotrimer (known as IFN-stimulated gene factor 3 complex; ISGF3), which translocates to the nucleus and drive the expression of classical IFN-stimulated genes (eg. *IRF1* and 2',5'-oligoadenylate synthetase 1 (*OAS1*)) upon binding to the relevant DNA responsive elements. In sheep, *STAT1* expression, which is restricted to endometrial stromal cells, is upregulated around implantation (Choi *et al.* 2001). In cattle, the only data available on *STAT1* expression is its identification as an endometrial gene differentially regulated during the maternal recognition period and at implantation (Bauersachs *et al.* 2006, 2012;

Klein *et al.* 2006; Forde *et al.* 2011b) in the aglandular caruncles (sites of superficial placentation) and the glandular intercaruncular areas, which synthesise and secrete numerous substances collectively named the histotroph (Mansouri-Attia *et al.* 2009a; Walker *et al.* 2010). Thus, no independent investigation has been published on STAT1 regulation, localisation and involvement in the bovine endometrium during the preimplantation period.

The present study aimed to gain new insights into the contribution of STAT1 to the regulation of endometrial physiology in ruminants. Using *in vivo* and *in vitro* experimental models, the impact of progesterone (P4), IFNT and pregnancy on the expression and the regulation of *STAT1* transcript and protein, as well as its phosphorylation status, was analysed in the bovine endometrium and endometrial cells. In addition, the regulation of *SOCS* genes by STAT1 was investigated at the transcriptional level using chromatin immunoprecipitation and primary cultures of stromal cells derived from the bovine endometrium.

Materials and methods

Animals and cell cultures

All experiments were performed in agreement with European Community Directive 86/609/EC, the Animal Research Ethics Committee of University College Dublin and the French Ministry of Agriculture (Authorisation B91332). Protocols were registered by the Department of Health and Children (Ireland) or by the Regional Ethical Committee of Animal Experimentation of INRA and AgroParisTech (France, Protocol 12–124).

Experiment 1: STAT1 expression during the maternal pregnancy recognition period

As previously described (Forde *et al.* 2011b; Eozenou *et al.* 2012), synchronised cross-bred beef heifers were artificially inseminated or not inseminated (cyclic cows). Animals were slaughtered at Day 16 (cyclic: $n = 5$, pregnant: $n = 4$) or at Day 20 after oestrus (cyclic: $n = 6$, pregnant: $n = 5$). Based on ovarian morphology (Arosh *et al.* 2002), all cows sampled at Day 20 of the cycle presented a regressed corpus luteum. Conceptuses were collected by uterine flushing and their correct stage of development was confirmed by microscopy (Degrelle *et al.* 2005). Endometrial caruncular (CAR) and intercaruncular (ICAR) tissues were collected separately from the ipsilateral horn to the corpus luteum as previously described (Mansouri-Attia *et al.* 2009b). Tissue samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C or fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA) in phosphate-buffered saline (PBS; Euromedex, Souffelweyersheim, France) for further analyses.

Experiment 2: endometrial STAT1 gene expression at implantation

Charolais cows were synchronised by the Crestar method (Mansouri-Attia *et al.* 2009a) and were artificially inseminated (cyclic: $n = 5$, pregnant: $n = 6$). On Day 20, animals were slaughtered and conceptuses were collected by uterine flushing.

Developmental stage of conceptuses was determined as described in Experiment 1. Cows sampled at Day 20 of the cycle had a regressed corpus luteum. Endometrium was collected as described in Experiment 1.

Experiment 3: regulation of endometrial STAT1 expression by short-term interferon-tau treatment

As previously described (Forde *et al.* 2011b; Eozenou *et al.* 2012), synchronised cyclic Charolais cows were infused into the uterine lumen with recombinant ovine interferon-tau (roIFNT; 1×10^8 anti-viral units mg^{-1} ; $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ in saline buffer, 25 mL per horn, 2 h) or a control saline solution at Day 14 after oestrus. Endometrium from five IFNT-infused and five control cows was collected as described in Experiment 1.

Experiment 4: impact of P4 supplementation on STAT1 expression

Synchronised cyclic and pregnant cross-bred beef heifers received a P4-releasing intravaginal device containing 1.55 g of P4 (Ceva Animal Health, Libourne, France) on Day 3 after oestrus, as previously published (Carter *et al.* 2008; Forde *et al.* 2011a; Eozenou *et al.* 2012). Females were slaughtered after 2 days (Day 5 after oestrus; normal P4 in cyclic heifers, $n = 4$ and in pregnant heifers, $n = 4$; high P4 in cyclic heifers, $n = 3$ and in pregnant heifers, $n = 2$) or 13 days (Day 16 after oestrus; normal P4 in cyclic heifers, $n = 3$ and in pregnant heifers, $n = 4$; high P4 in cyclic heifers, $n = 3$ and in pregnant heifers, $n = 5$) of P4 supplementation. Endometrium was collected and snap-frozen before being stored at -80°C .

Cell cultures

In order to analyse the regulation of *STAT1*, *IRF1* and *SOCS* genes *in vitro*, epithelial and stromal cell cultures were derived from bovine endometrial tissues sampled during the luteal phase according to ovarian morphology. Primary endometrial epithelial and stromal cells were cultured as previously described (Mansouri-Attia *et al.* 2009a; Cronin *et al.* 2012) and treated with 100 ng mL^{-1} or 1000 ng mL^{-1} of ovine recombinant IFNT solution for 0.5, 2 and 24 h. Each experiment was performed using stromal and epithelial cells isolated from four independent animals.

Total RNA extraction

Total RNA was extracted from frozen tissue using Trizol Reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's recommendations and as previously described (Mansouri-Attia *et al.* 2009b; Eozenou *et al.* 2012). DNase treatment followed by RNA purification was carried out using Qiagen columns according to the manufacturer's protocol (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Courtaboeuf, France). Cultured primary cells were washed with 1 mL of PBS and total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit and the automated system Qiacube (Qiagen, Crawley, UK; Cronin *et al.* 2012). Quality and integrity of total extracted and purified RNA was determined using an Agilent 2100 bioanalyser (Agilent Technologies France, Les Ulis, France). RNA Integrity Number (RIN) score ranged from 7.6 to 9.9; RNA concentration ranged from 97 to

$457 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (cell culture samples) and from 347 to $899 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (tissue samples). One μL of RNase inhibitor (RNAsin; Promega, Charbonnières-les-Bains, France) was added to each sample before storing at -80°C .

Real-time polymerase chain reaction (PCR)

As previously described (Mansouri-Attia *et al.* 2009b; Eozenou *et al.* 2012), $1 \mu\text{g}$ of total RNA was reverse transcribed into cDNA using OligodT ($0.5 \mu\text{g}$) and SuperScript II (200 U) in a $20\text{-}\mu\text{L}$ reaction volume (Invitrogen). Real-time PCR assays were performed using SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Saint Aubin, France) and the Step One Plus system (Applied Biosystems). A denaturation step (10 min at 90°C) was followed by 45 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C . Reactions were performed in duplicate and included a dissociation curve (15 s at 95°C , 20 s at 90°C , 15 s at 95°C) to ensure specificity of amplification. Primers were designed, in exonic regions, with Primer Express Software (Applied Biosystems) or Primer-BLAST (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome; verified 22 July 2014) and synthesised by Eurogentec (Angers, France). Primers are listed in Table 1. To assess the specific amplification of expected cDNA fragments, size and sequence of each amplicon was determined using agarose gel electrophoresis and DNA sequencing, respectively. Expression of each gene of interest was normalised to that of the most stable reference gene as determined by qBaseplus software (Biogazelle, Gent, Belgium) among six housekeeping genes (Table 1). Care was taken to consider Ct value within the linear amplification zone (Table 1). Gene expression was considered as significant when Ct values were lower than 34, and when one single DNA fragment with the expected size and sequence was amplified.

Western blotting

Frozen tissues were ground in liquid nitrogen and then resuspended ($200 \mu\text{L}$ per $100 \mu\text{g}$ of tissue) in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) solution (50 mM TRIS-HCl [pH 8], 150 mM NaCl , 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium desoxycholate, containing extemporaneously added protease inhibitor cocktail (Roche, Boulogne-Billancourt, France)). Samples were centrifuged at $20\,000g$ for 5 min at 4°C . The supernatant corresponding to the total protein extract was collected. All samples were stored at -80°C . Protein quantification was performed using the Bradford method with bovine serum albumin (BSA) as a standard (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Western blot immunoassays were processed as previously reported (Eozenou *et al.* 2012). Membranes were incubated with primary antibody overnight at 4°C , then incubated with the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit or goat anti-mouse; 1 : 5000; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) for 1 h at room temperature. The optimised primary antibodies were used as follows: rabbit anti-phospho-STAT1 (Tyr701) antibody, (1 : 200; Cell Signalling, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) in PBS-Tween 20 (PBS-T; 1 : 1000) solution containing 5% BSA and rabbit anti-STAT1 antibody (1 : 200; Santa Cruz Biotechnology) in PBS-T

Table 1. Description of the oligonucleotide primers used for bovine gene quantification by real time RT-PCR

NTC, no-template control; ND, not detected

Gene	Primers	Amplicon size (bp)	Accession number	Ct of NTC	Slope	Y intercept	PCR efficiency (%)	Linear dynamic range (Ct)
<i>STAT1</i>	F: GCATAGTCAGGGCCAAATTGTTACAG R: GCCAGATACAGGACAGCTTTGCAC	140	BC151378	ND	-3.446	33.3	95.0	20-36
<i>IRF1</i>	F: GCTGGGACATCAACAAGGAT R: CTTTCTCTGGCTCTTGGTG	232	XM_003584726	ND	-3.402	31.3	99.8	18-33
<i>CISH</i>	F: AGTCATCTGGTGGCCGTGA R: AGCCTTGTCTCTGCACACCG	69	NM_001046586	38.03	-3.099	37.8	110.2	25-37
<i>SOC51</i>	F: CTCGTACCTCTACCTTCTCATGTT R: ACAGCAGAAAAATAAAGCCAGAGA	92	XM_864316	ND	-3.473	37.5	94.0	23-34
<i>SOC52</i>	F: TGCAGGATAAGGGACAGG R: AGATGCTGCAAGGTGGTGTCT	101	NM_177523	36.27	-3.524	36.2	102.9	22.5-33
<i>SOC53</i>	F: GCCACTCTCAAACATCTCTGT R: TCCAGGAATCCCGAATGG	97	NM_174466	ND	-3.456	40.6	94.7	26-42
<i>SOC54</i>	F: GCTTTGTTAACCTATGTCAITGGCA R: ACAACACACACAGCTTTACCGAAG	100	NM_001076218	42	-3.428	36.8	95.7	23-37
<i>SOC55</i>	F: TACATCCAGTGGCTGTCCG R: GCACAGCAAGCAGAAACATACATT	100	NM_001046182	ND	-3.384	35.5	97.5	22-30
<i>SOC56</i>	F: AGAAGGTCAAAAAATGTCACAGGAA R: CAATGGTTAGCCTTTGGCAT	113	XM_005224062	ND	-3.476	34.3	93.9	20-35
<i>SOC57</i>	F: CTCCTCACTGCTTAAGCCTCTG R: GAAATGAGCTGGCTTCTCTT	102	NM_001206013	41	-3.188	35.4	105.9	22.5-32
<i>ACTB</i>	F: CCTGGACCCAGCACAA R: AGCGAGCCAGGATGGA	90	NM_173979	ND	-3.514	29.1	92.6	15-32
<i>C2ORF29</i>	F: CCTTCAAGAGCCCTGT R: GGGTCTTTTCCAACCTCC	64	XM_002691150	ND	-3.436	38.0	95.5	23-36
<i>GAPDH</i>	F: GCTGAGCTCCCATGTTTGT R: TCATAAGTCCCTCCACGATGC	432	NM_001034034	ND	-3.232	27.9	103.9	16-32
<i>RPL19</i>	F: CCCCAAATGAGACCAATGAAATC R: CAGCCCATCTTGTATCAGCTT	72	NM_001040516	ND	-3.521	30.2	92.3	16-33
<i>SLC30A6</i>	F: TGATAGGAAACCTAGCCCTGCC R: TGGGGCTGCTCAAAAACGCT	142	NM_001075766	ND	-3.502	37.3	93	23-36
<i>SUZ12</i>	F: CGTTGTGACAGTTTTGCCCCTGT R: ACCACAGTGTGGAGTTGGACT	139	NM_001205587	38	-3.325	33.5	99.9	19-34

solution containing 4% non-fat dry milk. To control for even loading, blots were hybridised with a mouse anti-actin B (ACTB) antibody (1:2000; Sigma-Aldrich) in PBS-T solution containing 4% non-fat dry milk. Immunoreactive proteins were detected with Luminata Western HRP chemiluminescent substrates (Millipore, Molsheim, France) and analysed using an image analysis system (Advanced Image Data Analyzer software; LAS 1000 camera; Fujifilm, Bois d'Arcy, France).

Immunohistochemistry

Sections of endometrium from the ipsilateral horn to the corpus luteum were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS overnight at 4°C. After three washes with PBS, samples were dehydrated with increasing concentrations of ethanol (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) in a Shandon Citadel 1000 tissue processor (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) for 12 h. Tissues were then embedded in paraffin and stored at 4°C until processing.

Sections (7 µm) were cut with a microtome Leica RM2245 (Leica, Nanterre, France) and then immunohistochemistry was performed essentially as described (Eozenou *et al.* 2012). Slides were incubated with the rabbit anti-STAT1 primary antibody (1:500; Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4°C. As a negative control, the primary antibody was incubated for 1 h with gentle rotation at room temperature with the blocking peptide (1:50; Santa Cruz Biotechnology). The anti-rabbit biotinylated secondary antibody (1:500; Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) was incubated for 1 h at room temperature. Staining was revealed with diaminobenzidine substrate and urea (SIGMAFAST 3,3'-diaminobenzidine tablets; Sigma-Aldrich) in Tris-buffer for 1.5 min. Slides were dehydrated then mounted in a Eutkitt mounting medium (Sigma-Aldrich). Images were acquired with a NanoZoomer Digital Pathology System and were then analysed with the NanoZoomer Digital Virtual Slide Viewer software (Hamamatsu, Japan). Each experiment was repeated for four females per biological condition with four fields observed per animal.

Immunofluorescence

Sub-confluent cultures of bovine stromal cells were incubated with recombinant ovine interferon-tau (roIFNT; 100 ng mL⁻¹) solution for 0, 15, 30, 60 or 120 min at 37°C. Cells were cultured on sterile cover slides and fixed with 90% v/v methanol for 5 min at -20°C, then were permeabilised with 0.5% TritonX-100 for 30 min at room temperature. Non-specific binding sites were blocked with 1 × PBS containing 2% BSA for 1 h at room temperature. The incubation with the rabbit anti-STAT1 primary antibody (1:20; BD Transduction Laboratories, Le Pont de Claix, France) was performed overnight at 4°C. As a negative control, slides were incubated without primary antibody overnight at 4°C. The donkey AffiniPure Anti-Mouse Cy5-conjugated IgG (1:200; Jackson ImmunoResearch) was incubated for 45 min. DNA was counterstained with DAPI (10 ng mL⁻¹; Invitrogen). Endometrial labelled cells were examined using a Zeiss ApoTome structured illumination system (AxioPlan Imaging; Zeiss, Le Pecq, France; MIMA2 platform; INRA, Jouy-en-Josas, France) and analysed with the AxioVision Microscopy Software (Zeiss). Experiments were

run using primary endometrial cultures derived from three different animals.

Chromatin immunoprecipitation

Monolayer cultures of endometrial stromal (fibroblasts) cells (3×10^8) were treated with roIFNT (100 ng mL⁻¹) for 30 min. An equal number of cells were left untreated. Cells were harvested using a silicon scraper, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until the chromatin immunoprecipitation (ChIP) was processed.

Cells were cross-linked in 1 × PBS (VWR-Prolabo, Fontenay sous Bois, France) containing 1% formaldehyde for 10 min at room temperature then quenched with 125 mM glycine (VWR-Prolabo) for 5 min at room temperature. After centrifugation, cells were washed twice in cold 1 × PBS. In order to prepare nuclear-enriched extracts, cells were re-suspended in hypotonic buffer (20 mM Hepes (pH 7.9), 10 mM KCl, 1 mM EDTA (pH 8), 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.1 mM sodium orthovanadate and 1 × protease inhibitor cocktail; Roche, Boulogne-Billancourt, France) for 15 min and homogenised with a dounce (Dounce B; Dominique Dutscher, Brumath, France; 30 stokes) on ice. The nuclei were collected by centrifugation at 20 000g for 3 min at 4°C. Nuclear pellets were incubated in nuclear lysis buffer (10 mM TRIS-HCl (pH 8), 200 mM NaCl, 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA; pH 8), 0.5 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) (pH 8), 1 × protease inhibitor cocktail) at 4°C and vortexed every 2 min for 10 min. After two washes, nuclei were re-suspended in shearing buffer (1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10 mM EDTA, 50 mM TRIS (pH 8.0), 1 × protease inhibitor cocktail). DNA was shorn using a Covaris S2 device (duty cycle: 20%, intensity: 8, cycles per burst: 200, bath temperature: 4°C; Covaris, MA, USA) for 30 min. Supernatant was recovered by centrifugation at 20 000g for 3 min at 4°C then soluble DNA was diluted at least 10 times in dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM TRIS-HCl, 167 mM NaCl). Immunoclearing was performed for 1 h at 4°C with protein A-agarose beads coated with salmon sperm DNA (50% of slurry; Millipore). A fraction of pre-cleared DNA solution (0.1% of total DNA) was kept as a control sample of DNA fragmentation (input sample). Immunoprecipitation was performed with a rabbit anti-STAT1 antibody (5.6 µg for 50 µg DNA; Santa Cruz Biotechnology) or anti-chicken IgG (Sigma-Aldrich) overnight at 4°C before adding Dynabeads Protein A (Invitrogen) for 2 h at 4°C. Immunoprecipitated beads were washed once in Washing Buffer 1 (0.1% SDS, 1% Triton X100, 2 mM EDTA, 20 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl), once in Washing Buffer 2 (0.1% SDS, 1% Triton X100, 2 mM EDTA, 20 mM TRIS-HCl, 500 mM NaCl), once in Washing Buffer 3 (0.25 M LiCl, 1% sodium deoxycolate, 1 mM EDTA, 10 mM TRIS-HCl, 10% Igepal) and then twice in TRIS-EDTA buffer (10 mM TRIS-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA). Washed beads were incubated in elution buffer (100 mM NaHCO₃, 1% SDS) for 30 min under agitation. The DNA-containing supernatant was obtained using DynaMag magnet (Invitrogen) and incubated overnight at 65°C to reverse the formaldehyde cross-link. DNA was purified by phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction and precipitation with ethanol. To analyse ChIP experiments,

Table 2. Description of the oligonucleotide primers used for quantifying immunoprecipitated bovine gene promoters by real-time PCR
 NTC, no-template control; ND, not detected

Promoter	Primers	Amplicon size (bp)	Accession number	Ct of NTC	Slope	Y intercept	PCR efficiency (%)	Linear dynamic range (Ct)
<i>IRF1</i>	F: CTTAGCCGCTAGCTTACAACAG R: CCGGGAATCTAAACACTTAGC	138	NW_003104019	35	-3.17	33.4	106.4	19-34
<i>CISH</i>	F: CTAATTGGCCCTCCCTGACC R: CCTAATCTTTTGTCTCTGTGTCCC	250	NW_003104544	ND	-3.38	28.8	97.6	28-34
<i>SOCS1</i>	F: GGCCCAACCCGGTTTCCAAG R: CCCTAGTCCCGGCGCTCTA	181	NW_003104571	ND	-3.03	35.9	113.8	21-34
<i>SOCS2</i>	F: GCAACTGCCCGGAGTCTCT R: GCGCGGATTTCCACAGCGTA	175	NW_003103917	ND	-3.178	40.6	106.4	22-36
<i>SOCS3</i>	F: CGCAGCCGGAAGCCAAAGA R: ACCCGAGAAAGCCGAAAG	226	NW_003104499	ND	-2.963	31.5	117.5	31-36
<i>SOCS7</i>	F: GACTAAAGGCCAGCGGAGAA R: CACCGAGCACACCCC	154	NW_003104495	41	-3.511	34.8	92.7	29-34

STAT1 binding elements were defined for *IRF1* and each *SOCS* promoter using Genomatix MatInspector Software (Genomatix Software GmbH, Munich, Germany) and primers surrounding these STAT1 binding sites were designed (Primer Express Software; Applied Biosystems; Table 2). The percentage of immunoprecipitation was calculated as immunoprecipitated DNA/input sample DNA ratio. CHIP experiments were repeated with two independent animals for each promoter.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed with the GraphPad Prism 6 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). *STAT1* gene expression (transcript or protein) in tissues was first subjected to a two-way ANOVA followed by paired *post hoc* Bonferroni tests to analyse effects of day, pregnancy status (cyclic or pregnant), endometrial areas (CAR and ICAR), IFNT and P4 impact and their interactions. IFNT impact on primary cultures of bovine endometrial cells was subjected to a one-way ANOVA analysis followed by Dunnett's multiple-comparison tests.

Results

Endometrial STAT1 expression during the oestrous cycle and preimplantation period

In order to characterise the regulation of STAT1 in the bovine endometrium, transcript and protein expression as well as phosphorylation level were analysed in the CAR and ICAR endometrial areas on Day 16 and Day 20 of the oestrous cycle and pregnancy.

Steady-state level of *STAT1* expression (transcript and protein) was stable between Days 16 and 20 of the oestrous cycle in CAR and ICAR endometrial areas (Fig. 1a, b). Compared with the cyclic CAR and ICAR areas, *STAT1* transcript level was higher in the pregnant counterparts ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively; Fig. 1a) and its expression significantly increased from Day 16 to Day 20. On the other hand, STAT1 protein and phosphorylation were affected by the conceptus in CAR and ICAR endometrial areas only on Day 20 of pregnancy ($P < 0.001$, Fig. 1b, c; Fig. S1a, available as Supplementary Material to this paper). In both experiments, no significant difference in *STAT1* gene expression was observed between CAR and ICAR endometrial areas.

On Days 16 and 20 of the oestrous cycle (Fig. 2a-c, d-f, respectively) no significant variation of STAT1 staining was observed; STAT1 protein was visible in the luminal epithelium, glandular epithelium, stromal cells as well as in the endothelial cells of blood vessels. The staining appears to be both cytoplasmic and nuclear. An impact of the conceptus on STAT1 staining was observed on Day 20 of pregnancy (Fig. 2j-l) where it increased in the cytoplasm of the stromal, glandular and vascular cells. Moreover, STAT1 nuclear localisation was reduced in the luminal epithelium at Day 20 of pregnancy compared with any other condition (Fig. 2k).

Regulation of endometrial STAT1 expression by two factors involved in bovine pregnancy maintenance

Two major factors have been shown to be necessary for maintaining bovine pregnancy: P4 and IFNT. The first is a steroid

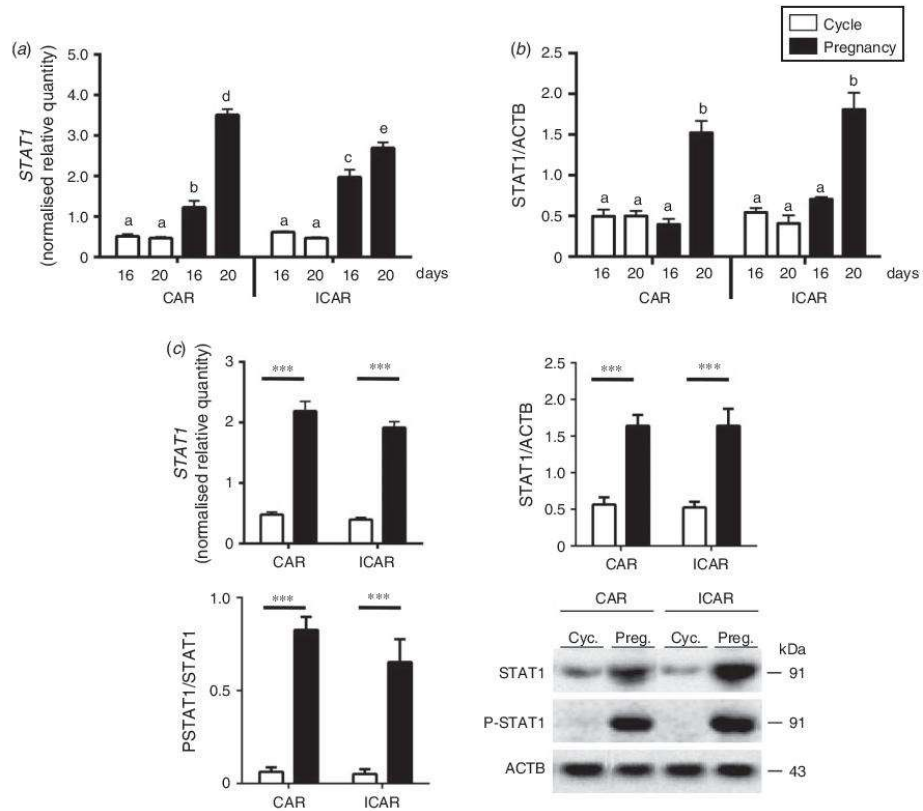


Fig. 1. Quantification of *STAT1* gene expression in cyclic and pregnant bovine endometrium on Day 16 and 20 of the oestrous cycle. Caruncular (CAR) and intercaruncular (ICAR) areas were collected from cyclic (Day 16, $n = 5$; Day 20, $n = 6$) and pregnant (Day 16, $n = 4$; Day 20, $n = 5$) cross-bred heifers as well as from cyclic ($n = 6$) and pregnant ($n = 5$) Charolais cows at Day 20 of the oestrous cycle. (a) Quantification of *STAT1* mRNA by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–qPCR) in cyclic and pregnant cross-bred beef heifers. Expression of *STAT1* was normalised to that of *RPL19* and *SCL30A6* using qBasePlus. Bars with different lowercase letters differ significantly ($P < 0.05$). (b) Quantification of STAT1 protein by western blotting, normalised to ACTB protein level. Bars with different lowercase letters differ significantly ($P < 0.001$). (c) The level of *STAT1* mRNA (normalised to *RPL19* and *SCL30A6*) as well as the amount of STAT1 (normalised to ACTB) and STAT1 phosphorylation level were analysed by RT–qPCR and western blotting, respectively. Asterisks denote significant effects ($***P < 0.001$).

hormone secreted by the corpus luteum, whereas the second is secreted by the trophoderm of the elongated conceptus during early pregnancy. In order to investigate the effect of these factors on endometrial *STAT1* expression *in vivo*, two experimental bovine models were developed.

In the endometrium of cyclic cross-bred beef heifers, no variation in *STAT1* gene level (transcript and protein) was observed between Day 5 and Day 16 after oestrus (Fig. 3). In cyclic females, 2-day and 13-day treatments of exogenous P4 did not significantly affect *STAT1* transcript and protein levels (Fig. 3). Whereas the 2-day treatment of exogenous P4 did not affect *STAT1* expression (mRNA and protein) in pregnant cows, the 13-day treatment induced a significant increase in the *STAT1* mRNA level without affecting the *STAT1* protein level (Fig. 3).

In the second experimental model, IFNT treatment of cyclic bovine endometrium during a short time (2 h) induced a significant increase in *STAT1* mRNA in CAR and ICAR endometrial areas ($P < 0.05$; Fig. 4a). Similarly, the *STAT1* mRNA level increased with both a 2-h and 24-h treatment of IFNT in primary cultures of stromal cells, while it only increased in epithelial cells with a 24-h treatment (see Fig. 6). Whereas no significant variation in *STAT1* protein level was detected (Fig. 4c), *STAT1* phosphorylation status significantly increased in CAR and ICAR areas in cyclic bovine endometrium treated with IFNT ($P < 0.05$; Fig. 4d). Moreover, IFNT treatment induced the translocation of *STAT1* to the nuclei in the epithelial, stromal and glandular cells *in vivo* (Fig. 5) as well as in primary cultured fibroblastic cells (Fig. S1b; 15 and 30 min of treatment).

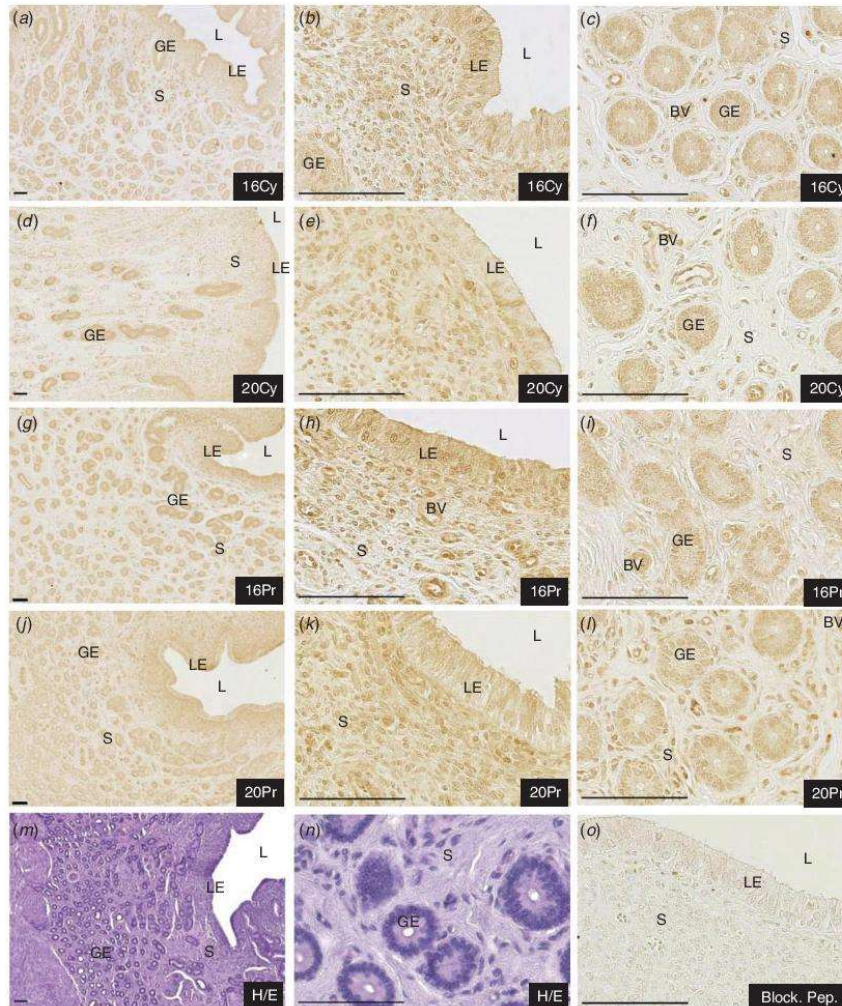


Fig. 2. Cellular localisation of STAT1 expression in cyclic or pregnant bovine intercaruncular endometrium. Immunohistochemistry was performed using sections cut from cross-bred beef heifers sampled at (a–c) Day 16 (16Cy) and (d–f) Day 20 of the oestrous cycle (20Cy) as well as (g–i) Day 16 (16Pr) and (j–l) Day 20 (20Pr) of pregnancy. (a–l) Sections were incubated with anti-STAT1 primary antibody. (m–n) Tissue samples were stained with haematoxylin–eosin solution. (o) Tissue samples were co-incubated with the anti-STAT1 antibody and blocking peptide as a negative control. BV, blood vessel; GE, glandular epithelium; LE, luminal epithelium; S, stroma. Bars = 100 μ m.

Regulation of IRF1 and SOCS genes by IFNT in primary cultures of bovine endometrial cells

We investigated the regulation of *IRF1* (a transcription factor known to be involved in the cytokine signalling pathway) and *SOCS* (a family of negative regulators of the cytokine signalling pathway) gene expression in primary cultures of endometrial epithelial and stromal cells treated by roIFNT (100 ng mL⁻¹;

0.5, 2 and 24 h; Fig. 6). No significant difference was observed between treatments with 100 or 1000 ng mL⁻¹ of IFNT (data not shown). No variation in *SOCS4–7* mRNA levels was observed in epithelial and stromal cells. In IFNT-treated epithelial cells, no significant induction of *CISH* mRNA was apparent, whereas *SOCS3* mRNA expression slightly increased at 0.5 and 2 h ($P < 0.001$). Upregulation of *IRF1*, *SOCS1* and *SOCS2* mRNA

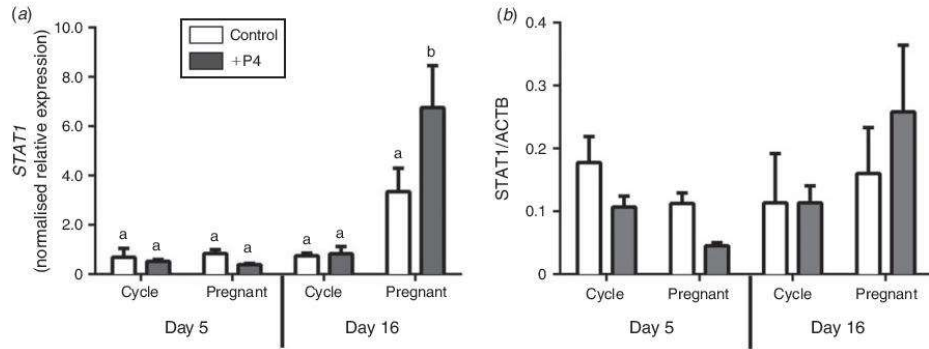


Fig. 3. *STAT1* endometrial expression in cyclic and pregnant cross-bred beef heifers supplemented with progesterone (P4) for 2 days (Day 3 to Day 5) or 13 days (Day 3 to Day 16). *STAT1* (a) mRNA and (b) protein levels were quantified by RT-qPCR and by western blotting, respectively (Day 5: cyclic heifers with normal level of P4, $n = 4$; cyclic heifers supplemented with P4, $n = 3$; pregnant heifers with normal level of P4, $n = 4$; pregnant heifers supplemented with P4, $n = 2$; Day 16: cyclic heifers with normal level of P4, $n = 3$; cyclic heifers supplemented with P4, $n = 3$; pregnant heifers with normal level of P4, $n = 4$; pregnant heifers supplemented with P4, $n = 5$). Messenger RNA and protein levels were normalised to *ACTB* and *RPL19* using qBasePlus and to *ACTB*, respectively. Bars (mean \pm s.e.m.) represent the different conditions.

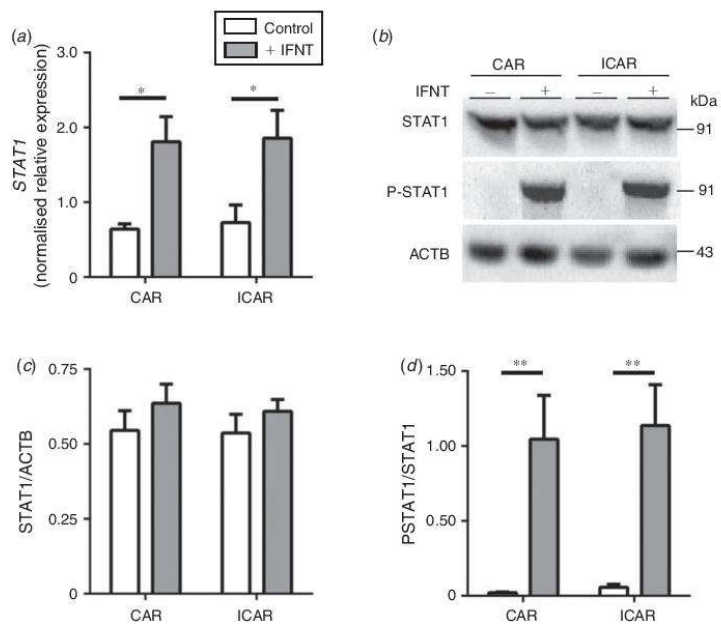


Fig. 4. *In vivo* regulation of endometrial *STAT1* expression by interferon-tau (IFNT). CAR and ICAR endometrial areas were collected from Charolais cows infused with control solution ($n = 5$) or recombinant ovine IFNT (roIFNT, $200 \mu\text{g mL}^{-1}$; $n = 6$) for 2 h. (a) *STAT1* mRNA level was quantified by RT-qPCR and normalised to *C2ORF29*, *SLC30A6* and *SUZ12* using qBasePlus. (b) Analysis of *STAT1* protein amount and *STAT1* phosphorylation by western blotting. (c) Quantification of *STAT1* protein amount. (d) Quantification of *STAT1* phosphorylation (PSTAT1) level. *STAT1* and PSTAT1 expression were normalised to that of *ACTB* and *STAT1* protein level, respectively. Data are the mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

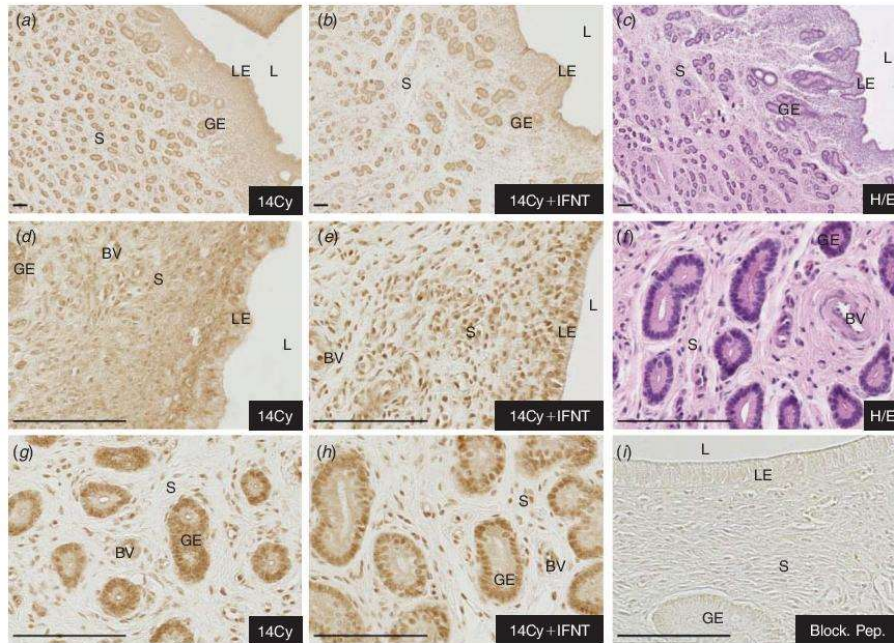


Fig. 5. STAT1 localisation in bovine intercaruncular endometrium at Day 14 of the oestrous cycle (*b, e, h*) infused (14Cy+IFNT) or (*a, d, g*) not infused with IFNT (14Cy). Tissue samples were incubated with STAT1 primary antibody. (*c, f*) Tissue samples were stained with haematoxylin-eosin solution. (*i*) Tissue section was co-incubated with anti-STAT1 antibody and the blocking peptide as a negative control. BV, blood vessel; GE, glandular epithelium; LE, luminal epithelium; S, stroma. Bars = 100 µm.

expression was restricted to the 2-h time point ($P < 0.05$). In stromal cells, *IRF1*, *SOCS1*, *SOCS3* and, to a lesser extent, *CISH* mRNA induction started as early as 0.5 h after IFNT addition ($P < 0.05$). For these four genes, RNA expression peaked at 2 h of IFNT treatment ($P < 0.01$) before declining to a non-significant threshold at 24 h. *SOCS2* expression was increased with a 2- and 24-h IFNT treatment ($P < 0.05$). Thus, stromal cells appeared to be more sensitive than epithelial cells to IFNT treatment.

STAT1 binding induced by IFNT on *IRF1* and *SOCS* gene promoters

In order to analyse the putative regulation of *IRF1*–*SOCS* genes by STAT1, the presence and the position of STAT binding sites were investigated in a 1000-bp genomic region upstream of the transcription start site (TSS; Fig. 7) based on literature and MatInspector analysis. *IRF1*, *CISH*, *SOCS1*, *SOCS2*, *SOCS3* and *SOCS7* gene upstream regions presented at least one STAT binding site (Fig. 7) whereas *SOCS4*, *SOCS5* and *SOCS6* did not. Based on the regulation of IFNT early target genes (Fig. 6) and the presence of STAT1 in the nucleus of stromal cells (Fig. S1b), the binding of STAT1 was analysed by ChIP on stromal cells with a very short IFNT treatment (30 min, 100 ng mL⁻¹; Fig. 8). IFNT induced an increase in STAT1 binding on *IRF1* (4.7-fold),

CISH (6.3-fold), *SOCS1* (2.3-fold) and *SOCS3* (2.4-fold) promoters. A decrease was observed for the *SOCS2* promoter (0.3-fold) and no significant change was observed for the *SOCS7* promoter. Thus, a correlation was observed between the recruitment of STAT1 and the transcriptional induction of IFNT early target genes by IFNT.

Discussion

As suspected from pioneer analyses that investigated *STAT1* gene expression and regulation in the ovine endometrium (Choi *et al.* 2001), high-throughput analyses have listed *STAT1* as a differentially expressed gene in the bovine pregnant endometrium compared with cyclic tissue collected from Day 15 to Day 20 of the oestrous cycle (Bauersachs *et al.* 2006, 2012; Klein *et al.* 2006; Mansouri-Attia *et al.* 2009b; Walker *et al.* 2010; Forde *et al.* 2011b). Based on the use of bovine or ovine cell lines, *in vitro* analyses have also highlighted the transcription factor STAT1 as a major component of the IFNT transduction pathway (Binelli *et al.* 2001; Stewart *et al.* 2001; Kim *et al.* 2003). Nevertheless characterisation of *STAT1* has not yet been reported in the bovine endometrium. The present study provides the spatio-temporal expression pattern of endometrial *STAT1* during the oestrous cycle and early pregnancy in cattle, including its regulation by P4 and IFNT *in vivo*. Moreover, our

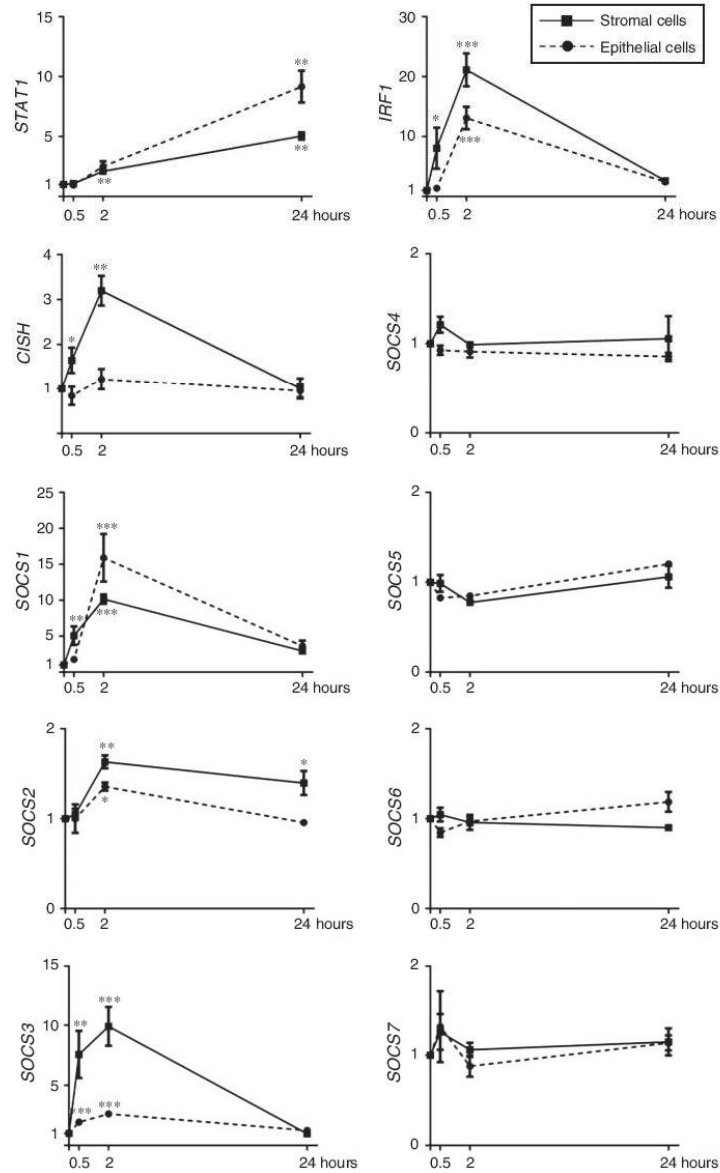


Fig. 6. Regulation of gene expression by interferon-tau (IFNT) in primary cultures of bovine endometrial cells. Stromal (solid line) and epithelial cells (dashed line) isolated from bovine endometrium were treated with recombinant ovine IFNT (roIFNT; 100 ng mL⁻¹) for 0.5, 2 or 24 h. *STAT1*, *IRF1*, *CISH* and *SOCS1-7* mRNA levels were quantified by RT-qPCR. For each gene, mRNA expression was normalised to that of *RPL19* and *ACTB* using qBasePlus. Fold increase was calculated as the ratio of (IFNT-treated cells/untreated cells) at 0.5, 2 or 24 h. The experiment was repeated with four independent animals. Significance was evaluated by comparing stimulated versus non-stimulated cells. Data are means \pm s.e.m. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

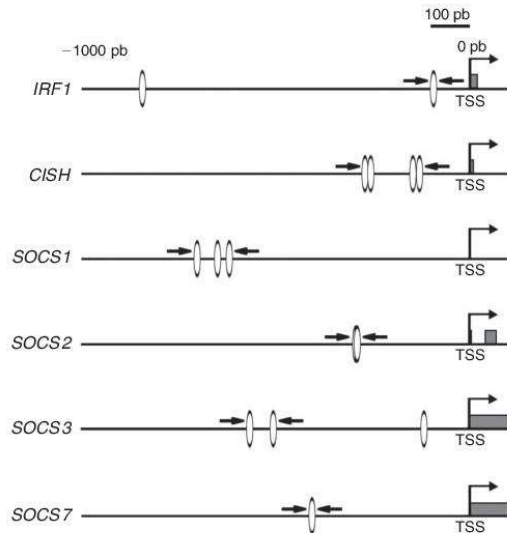


Fig. 7. Schematic representation of bovine *IRF1*, *CISH* and *SOCS1*, -2, -3 and -7 upstream regions (1000 bp) before the transcription start site (TSS). Transcription factor binding site (TFBS) positions for STAT1 were determined using MatInspector (Genomatix) and are indicated with a white circle. No STAT1 TFBS was identified in *SOCS4*, -5 or -6 bovine promoters.

analyses provide the first insights into the direct interaction of STAT1 with the promoters of various members of the SOCS gene family in primary cultures of bovine endometrial stromal cells using ChIP.

In the bovine endometrium, our data have shown a sustained *STAT1* transcript level throughout the oestrous cycle (Day 5 to Day 20) in keeping with the detectable and stable level of STAT1 protein determined in luteal (Day 16) and follicular (Day 20) stages. This situation resembles that reported for the human uterus, whose endometrial glandular and stromal cells expressed STAT1 throughout the menstrual cycle despite a reduced expression at the protein and mRNA level in the active secretory phase (Jabbour *et al.* 1998; Talbi *et al.* 2006). However, our results clearly differ from those on *STAT1* gene regulation reported in the ewe and the sow. In these species, *STAT1* mRNA expression was shown to decline during the transition from the luteal to the follicular phase (Choi *et al.* 2001; Joyce *et al.* 2007). Moreover, from Day 14 to Day 20 of the oestrous cycle, the cell distribution investigated in the present study indicated the presence of STAT1 in the endometrial glands, stromal cells as well as the luminal epithelium, although in this latter cell population the staining was fainter but still visible at Day 20. Again, the sustained expression of STAT1 in the various cell populations of the bovine endometrium contrasts with the barely detectable or undetectable STAT1 protein expression described in the cyclic ovine and porcine endometrium, respectively (Choi *et al.* 2001; Joyce *et al.* 2007). Although the biological meaning of this discrepancy between cattle and these two other livestock species is unclear, the

regulation of *STAT1* expression by P4 appears consistent between cattle and sheep. Indeed, in the present work, P4-supplemented cyclic heifers did not exhibit any significant impact of the short (2 days) or long-term (13 days) P4 treatment on *STAT1* RNA or protein level. Moreover, *STAT1* gene expression was not correlated with circulating P4 levels (A. Vitorino Carvalho and N. Forde, unpubl. data). Similarly, in ovariectomised ewes supplemented with physiological levels of P4, the injection of a P4 antagonist did not affect the expression of *STAT1* mRNA (Gray *et al.* 2006). Collectively, the results strongly argue for no impact of P4 on the global regulation of *STAT1* gene expression in the endometrium of ruminants.

In the pregnant CAR and ICAR endometrial areas compared with the cyclic tissues, the increase in *STAT1* transcript level began during the period of maternal recognition of pregnancy (Day 16) and was amplified at implantation (Day 20). The time-course of endometrial *STAT1* mRNA expression was consistent with the identification of *STAT1* as a differentially expressed gene in the bovine pregnant endometrium compared with the cyclic endometrium from Day 15 of pregnancy onwards (Mansouri-Attia *et al.* 2009b; Walker *et al.* 2010; Forde *et al.* 2011b; Bauersachs *et al.* 2012) and the increase of endometrial *STAT1* transcript level in pregnant ewes and sows (Choi *et al.* 2001; Joyce *et al.* 2007). At Day 20 of pregnancy in the present study, the quantification of STAT1 protein revealed a significant increase that could be associated with Tyr701 phosphorylation, a landmark for STAT1 dimerisation, translocation to the nucleus and activation of gene transcription (Levy and Darnell 2002; Mohr *et al.* 2012). This increase in tyrosine phosphorylation was already detectable at Day 18 of pregnancy in Holstein heifers (A. Vitorino Carvalho, unpubl. data), whereas it was barely detectable during the oestrous cycle (present study and A. Vitorino Carvalho and N. Forde, unpubl. data). Therefore, conceptus secretions and the process of implantation not only stimulate *STAT1* gene expression but they are also associated with STAT1 biological activation in the bovine endometrium.

Among the conceptus secretions that have been studied, IFNT has been identified as the maternal recognition of pregnancy signal in ruminants (Roberts 2007; Ealy and Yang 2009). This Type I IFN affects endometrial physiology, as determined by gene-expression profiles (Spencer *et al.* 2008; Bauersachs and Wolf 2012). In cyclic ewes, intrauterine injections of IFNT for 4 days increased endometrial *STAT1* mRNA expression (Choi *et al.* 2001). A similar increase in *STAT1* transcription was reported by Bauersachs *et al.* (2012) using a 2-day intrauterine release of recombinant IFNA2, another Type I interferon. Based on primary cultures of endometrial stromal cells, our *in vitro* analysis showed an acute IFNT effect (15 to 30 min) on the induction of STAT1 nuclear translocation, as previously described in immortalised ovine and bovine endometrial epithelial cells (Binelli *et al.* 2001; Stewart *et al.* 2001). In our primary cultures of endometrial cells, we also determined that the 2-h and 24-h IFNT treatments stimulated bovine *STAT1* gene expression. Investigating the impact of an *in vivo* short-term infusion of IFNT into bovine uteri, we showed a stimulation of *STAT1* transcriptional expression as well as a trigger of tyrosine phosphorylation and nuclear accumulation of STAT1 in endometrial stromal cells, glandular cells and luminal epithelium

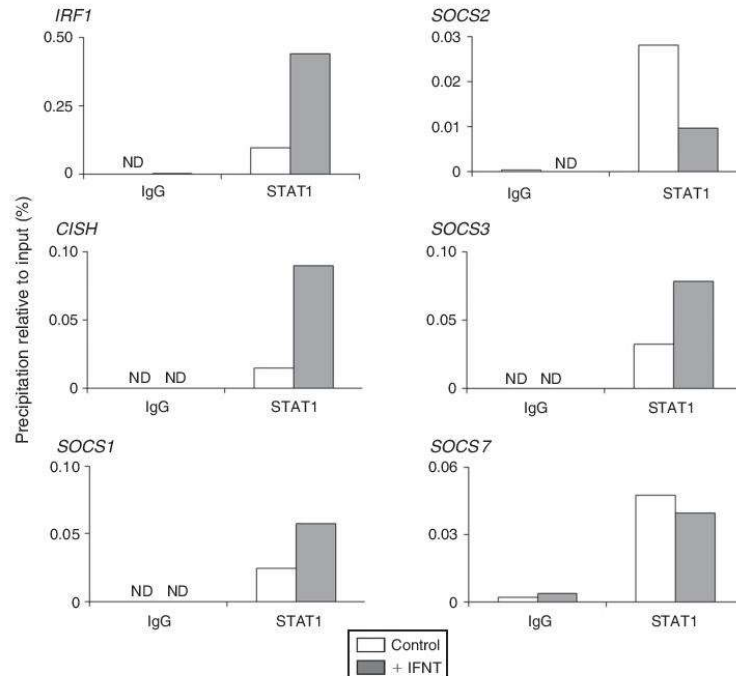


Fig. 8. IFNT-induced recruitment of STAT1 binding to bovine *IRF1*, *CISH*, *SOCS1*, -2, -3 and -7 promoters in primary cultures of bovine endometrial stromal cells. Cells were treated with roIFNT (100 ng mL^{-1}) for 30 min, harvested then fixed with formaldehyde and sonicated to reduce the DNA length to between 500 and 1000 bp. The sonicated chromatin was immunoprecipitated with anti-STAT1 antiserum or IgG (as a control for non-specific immunoprecipitation). After deproteination and reversal of cross-links, the amount of DNA sequence for each promoter was assessed in the immunoprecipitates by real-time PCR. Input indicates samples before immunoprecipitation. Results are presented as the percentage of DNA immunoprecipitated for each gene promoter relative to input DNA. ND, not determined.

cells. According to the definition used for IFN-stimulated genes (*ISG*) in our previous work carried out with bovine endometrium (Mansouri-Attia *et al.* 2009a), the present study highlights STAT1 as an IFNT-induced gene whose phosphorylation and nucleocytoplasmic shuttling are IFNT-regulated.

Although IFNT is recognised as a regulator of STAT1 expression and biological activities, several elements indicate that other IFNs are involved in the modulation of endometrial STAT1 expression and function. In humans, *STAT1* mRNA level was increased in decidual cells co-cultured with trophoblast cells (Popovici *et al.* 2006) or incubated with trophoblast secretions (Hess *et al.* 2007). In the porcine endometrium, *STAT1* transcript expression was stimulated by the conceptus from Day 12 of pregnancy onwards (Joyce *et al.* 2007). The *IFNT* gene has not been identified in human and pig genomes, therefore the stimulating actions of the conceptus secretions on endometrial *STAT1* gene expression are thought to be elicited by alternative trophoblast-produced IFNs including IFNG and IFND or IFNA and IFND in pigs and humans, respectively

(Joyce *et al.* 2007; Roberts *et al.* 2008). Consequently, although conceptus signals differ between species, regulation of *STAT1* gene expression and protein activation during early pregnancy appears to be a conserved feature in the mammalian endometrium.

It is worth noting that uterine STAT1 is not exclusively regulated by Type I and II IFNs during the establishment of pregnancy. Indeed oestrogen produced by conceptuses was shown to stimulate *STAT1* gene expression in the luminal epithelium of the porcine endometrium (Joyce *et al.* 2007). Interestingly, our findings indicated that the *STAT1* transcript level peaked at Day 20 of pregnancy and remained highly expressed until Days 32–34 of pregnancy (Oliveira *et al.* 2010). At Day 20 of pregnancy the high level of endometrial *STAT1* mRNA coincides with the sustained protein expression and phosphorylation of STAT1. This high endometrial STAT1 expression questions the nature of the factors that could regulate STAT1 during the peri-implantation period. Ovine placental lactogen, a member of the prolactin-growth hormone

(PRL–GH) family, has been reported to prolong STAT1 phosphorylation through the heterodimerisation of PRL and GH receptors, both expressed in the ruminant endometrium (Postel-Vinay and Kelly 1996; Biener *et al.* 2003). Bovine placental lactogen (PL or CSH) is secreted by the binucleate trophoblast cells from Day 18 of pregnancy onwards (Kessler *et al.* 1991; Wooding *et al.* 1992) but, to our knowledge, actions of placental lactogens on the uterine JAK–STAT pathway have not been reported. Consequently, the regulation of endometrial STAT1 by bovine CSH merits investigation.

In sheep and pigs, the upregulation of *STAT1* gene expression by IFNT, IFNG or IFND takes place in the endometrial stromal cells and deep glandular epithelium but not in the luminal epithelium (Choi *et al.* 2001; Joyce *et al.* 2007). In the present work, immunoreactive STAT1 was visible in the cytoplasm and the nucleus of the main populations of endometrial cells including luminal epithelium at Day 16 of pregnancy, whereas the staining strongly decreased in the luminal epithelium of Day-20 pregnant endometrium. This latter result is consistent with the absence of detectable STAT1 protein in the ovine endometrial luminal epithelium at Day 15 of pregnancy (Choi *et al.* 2001). Although the expression of IRF2 has not been investigated in cattle, the inhibition of STAT1 expression in the bovine endometrial luminal epithelium may result from the action of IRF2, known to repress the expression of ISG at the genomic level in the ovine endometrial luminal epithelium (Choi *et al.* 2001).

In keeping with the nuclear localisation of the activated phosphorylated STAT1 in IFNT-stimulated endometrial cells (stroma and glandular epithelium) determined *in vivo*, we identified *IRF1* as well as several members of the SOCS family (*SOCS1*, -3 and, to a lesser extent, *CISH* and *SOCS2*) as IFNT-induced genes in primary cultures of endometrial epithelial and stromal cells. Whereas the upregulation of *IRF1*, *SOCS1* and *CISH* gene expression was not significant in epithelial cells earlier than 2 h after IFNT treatment, the time-course of *IRF1*, *SOCS1*, *SOCS3* and *CISH* gene stimulation peaked at 2 h before dropping at 24 h. When compared with epithelial cells, the reason for the more rapid biological response of stromal cells to IFNT is currently unclear but likely reflects a rapid mobilisation of STAT1 to the target sites of IFNT target genes. In order to demonstrate that *IRF1*, *CISH*, *SOCS1* and *SOCS3* gene upregulation was STAT1-dependant, chromatin immunoprecipitation was performed and established for the first time the association of STAT1 on identified binding sites of bovine *IRF1*, *SOCS1* and *SOCS3* promoters following a short-term IFNT treatment. For these genes, as for *SOCS7*, the detection or the absence of STAT1 binding on their promoters was consistent with the regulation of mRNA expression. *SOCS1* and, to a lesser extent *SOCS3*, gene expression patterns have been reported to fit with the profile of IFNT secretion in the ovine endometrium (Sandra *et al.* 2005). Altogether our findings identify *SOCS1* and *SOCS3* as two immediate early STAT1 target genes in the endometrium of ruminants. In human cell lines, *SOCS2* did not block STAT1 activity whereas *SOCS1* was a much stronger inhibitor of STAT1 activation than *SOCS3* (Song and Shuai 1998). In IFNT-treated endometrial cells, our data strongly suggest a similar hierarchy in the control of the STAT1 signalling pathway.

Collectively our data have demonstrated that STAT1 expression detected in the cyclic endometrium is upregulated by early pregnancy at the transcript and protein levels including an impact on the phosphorylation level. The present study has identified (1) IFNT as a major regulator of bovine STAT1 expression and biological activities *in vivo* and (2) phosphorylated STAT1 as a mediator of the rapid effect of IFNT on the transcriptional regulation of ISG in endometrial glandular and stromal cells. We have shown IFNT-induced *SOCS1* and *SOCS3* to be immediate STAT1 target genes that may contribute to the downregulation of the STAT1-dependent IFNT signalling pathway in the bovine endometrium. Based on the spatio-temporal regulation of *STAT1* in the endometrium, future experiments will be necessary to identify factors affecting STAT1 activity as well as to characterise STAT1-responsive genes in order to better understand the biological functions regulated by this transcription factor in the various cells composing the endometrium, particularly during pregnancy maternal recognition and the implantation process.

Acknowledgements

We are grateful to M. Pannetier, S. Kennedy and his team (INRA, Jouy-en-Josas, France) for the ChIP experiment support as well as V. Loux and J-F. Gibra for promoter analyses (INRA). We thank G. Charpigny (INRA) for supplying recombinant ovine IFNT. We also thank the PICT platform (INRA) for access to the Agilent analyser, the MIMA2 platform (INRA) for access to confocal microscopy and the staff of INRA experimental units (Avord, France; Saint-Genès-Champanelle, France; Nouzilly, France) for animal management and tissue collection. A. Vitorino Carvalho is a PhD recipient from the French Ministry for Teaching and Research – Doctoral School ED419 Université Paris Sud. This work was partially supported by the European Network of Excellence ‘Embryo Implantation Control’ (EMBI; LSHN-CT-2004-512040; coordinator: G. Chaouat, INSERM), ANR-08-GENM-037, AIP Bioresources CHIPSTRAFFIC, Science Foundation Ireland and the Higher Education Authority Irish Centre for High-End Computing (ICHEC) and the UK Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC; BB/1017240/1).

References

- Arosh, J. A., Parent, J., Chapdelaine, P., Sirois, J., and Fortier, M. A. (2002). Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the oestrous cycle. *Biol. Reprod.* **67**(1), 161–169. doi:10.1095/BIOLREPROD67.1.161
- Bauersachs, S., and Wolf, E. (2012). Transcriptome analyses of bovine, porcine and equine endometrium during the pre-implantation phase. *Anim. Reprod. Sci.* **134**(1–2), 84–94. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2012.08.015
- Bauersachs, S., Ulbrich, S. E., Gross, K., Schmidt, S. E., Meyer, H. H., Wenigerkind, H., Vermehren, M., Sinowatz, F., Blum, H., and Wolf, E. (2006). Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction* **132**(2), 319–331. doi:10.1530/REP.1.00996
- Bauersachs, S., Ulbrich, S. E., Zakhartchenko, V., Minten, M., Reichenbach, M., Reichenbach, H. D., Blum, H., Spencer, T. E., and Wolf, E. (2009). The endometrium responds differently to cloned versus fertilised embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**(14), 5681–5686. doi:10.1073/PNAS.0811841106
- Bauersachs, S., Ulbrich, S. E., Reichenbach, H. D., Reichenbach, M., Buttner, M., Meyer, H. H., Spencer, T. E., Minten, M., Sax, G., Winter, G., and Wolf, E. (2012). Comparison of the effects of early

- pregnancy with human interferon, alpha 2 (IFNA2), on gene expression in bovine endometrium. *Biol. Reprod.* **86**(2), 46. doi:10.1095/BIOLREPROD.111.094771
- Bednorz, N. L., Brill, B., Klein, A., Gabel, K., and Groner, B. (2011). Tracking the activation of Stat5 through the expression of an inducible reporter gene in a transgenic mouse line. *Endocrinology* **152**(5), 1935–1947. doi:10.1210/EN.2011-0053
- Biener, E., Martin, C., Daniel, N., Frank, S. J., Centonze, V. E., Herman, B., Djiane, J., and Gertler, A. (2003). Ovine placental lactogen-induced heterodimerisation of ovine growth hormone and prolactin receptors in living cells is demonstrated by fluorescence resonance energy transfer microscopy and leads to prolonged phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (STAT)1 and STAT3. *Endocrinology* **144**(8), 3532–3540. doi:10.1210/EN.2003-0096
- Binelli, M., Subramanian, P., Diaz, T., Johnson, G. A., Hansen, T. R., Badinga, L., and Thatcher, W. W. (2001). Bovine interferon-tau stimulates the Janus kinase–signal transducer and activator of transcription pathway in bovine endometrial epithelial cells. *Biol. Reprod.* **64**(2), 654–665. doi:10.1095/BIOLREPROD64.2.654
- Carter, F., Forde, N., Duffy, P., Wade, M., Fair, T., Crowe, M. A., Evans, A. C., Kenny, D. A., Roche, J. F., and Lonergan, P. (2008). Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reprod. Fertil. Dev.* **20**(3), 368–375. doi:10.1071/RD07204
- Catalano, R. D., Johnson, M. H., Campbell, E. A., Charnock-Jones, D. S., Smith, S. K., and Sharkey, A. M. (2005). Inhibition of Stat3 activation in the endometrium prevents implantation: a nonsteroidal approach to contraception. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**(24), 8585–8590. doi:10.1073/PNAS.0502343102
- Choi, Y., Johnson, G. A., Burghardt, R. C., Berghman, L. R., Joyce, M. M., Taylor, K. M., Stewart, M. D., Bazer, F. W., and Spencer, T. E. (2001). Interferon regulatory factor-two restricts expression of interferon-stimulated genes to the endometrial stroma and glandular epithelium of the ovine uterus. *Biol. Reprod.* **65**(4), 1038–1049. doi:10.1095/BIOLREPROD65.4.1038
- Cronin, J. G., Turner, M. L., Goetze, L., Bryant, C. E., and Sheldon, I. M. (2012). Toll-like receptor 4 and MYD88-dependent signalling mechanisms of the innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol. Reprod.* **86**(2), 51. doi:10.1095/BIOLREPROD.111.092718
- Degrelle, S. A., Campion, E., Cabau, C., Piumi, F., Renaud, P., Richard, C., Renard, J. P., and Hue, I. (2005). Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Dev. Biol.* **288**(2), 448–460. doi:10.1016/J.YDBIO.2005.09.043
- Dimitriadis, E., Sharkey, A. M., Tan, Y. L., Salamonsen, L. A., and Sherwin, J. R. (2007). Immunolocalisation of phosphorylated STAT3, interleukin 11 and leukaemia inhibitory factor in endometrium of women with unexplained infertility during the implantation window. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **5**, 44. doi:10.1186/1477-7827-5-44
- Ealy, A. D., and Yang, Q. E. (2009). Control of interferon-tau expression during early pregnancy in ruminants. *Am. J. Reprod. Immunol.* **61**(2), 95–106. doi:10.1111/J.1600-0897.2008.00673.X
- Eozenou, C., Vitorino Carvalho, A., Forde, N., Giraud-Delville, C., Gall, L., Lonergan, P., Auguste, A., Charpigny, G., Richard, C., Pannetier, M., and Sandra, O. (2012). FOXL2 is regulated during the bovine oestrous cycle and its expression in the endometrium is independent of conceptus-derived interferon tau. *Biol. Reprod.* **87**(2), 32. doi:10.1095/BIOLREPROD.112.101584
- Forde, N., Beltman, M. E., Duffy, G. B., Duffy, P., Mehta, J. P., O’Gaora, P., Roche, J. F., Lonergan, P., and Crowe, M. A. (2011a). Changes in the endometrial transcriptome during the bovine oestrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biol. Reprod.* **84**(2), 266–278. doi:10.1095/BIOLREPROD.110.085910
- Forde, N., Carter, F., Spencer, T. E., Bazer, F. W., Sandra, O., Mansouri-Attia, N., Okumu, L. A., McGettigan, P. A., Mehta, J. P., McBride, R., O’Gaora, P., Roche, J. F., and Lonergan, P. (2011b). Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant? *Biol. Reprod.* **85**(1), 144–156. doi:10.1095/BIOLREPROD.110.090019
- Forde, N., Mehta, J. P., Minten, M., Crowe, M. A., Roche, J. F., Spencer, T. E., and Lonergan, P. (2012). Effects of low progesterone on the endometrial transcriptome in cattle. *Biol. Reprod.* **87**(5), 124. doi:10.1095/BIOLREPROD.112.103424
- Gray, C. A., Abbey, C. A., Beremand, P. D., Choi, Y., Farmer, J. L., Adelson, D. L., Thomas, T. L., Bazer, F. W., and Spencer, T. E. (2006). Identification of endometrial genes regulated by early pregnancy, progesterone and interferon tau in the ovine uterus. *Biol. Reprod.* **74**(2), 383–394. doi:10.1095/BIOLREPROD.105.046656
- Hess, A. P., Hamilton, A. E., Talbi, S., Dosiou, C., Nyegaard, M., Nayak, N., Genbecev-Krtolica, O., Mavrogianis, P., Ferrer, K., Krussel, J., Fazleabas, A. T., Fisher, S. J., and Giudice, L. C. (2007). Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol. Reprod.* **76**(1), 102–117. doi:10.1095/BIOLREPROD.106.054791
- Ivashkiv, L. B., and Hu, X. (2004). Signalling by STATs. *Arthritis Res. Ther.* **6**(4), 159–168. doi:10.1186/AR1197
- Jabbour, H. N., Critchley, H. O., and Boddy, S. C. (1998). Expression of functional prolactin receptors in non-pregnant human endometrium: Janus kinase-2, signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1) and STAT5 proteins are phosphorylated after stimulation with prolactin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**(7), 2545–2553. doi:10.1210/JCEM.83.7.4989
- Ji, Y. Q., Zhang, Y. Q., Li, M. Q., Du, M. R., Wei, W. W., and Li da, J. (2011). EPO improves the proliferation and inhibits apoptosis of trophoblast and decidual stromal cells through activating STAT-5 and inactivating p38 signal in human early pregnancy. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **4**(8), 765–774.
- Joyce, M. M., Burghardt, R. C., Geisert, R. D., Burghardt, J. R., Hooper, R. N., Ross, J. W., Ashworth, M. D., and Johnson, G. A. (2007). Pig conceptuses secrete oestrogen and interferons to differentially regulate uterine STAT1 in a temporal and cell type-specific manner. *Endocrinology* **148**(9), 4420–4431. doi:10.1210/EN.2007-0505
- Kessler, M. A., Duello, T. M., and Schuler, L. A. (1991). Expression of prolactin-related hormones in the early bovine conceptus, and potential for paracrine effect on the endometrium. *Endocrinology* **129**(4), 1885–1895. doi:10.1210/ENDO-129-4-1885
- Kim, S., Choi, Y., Bazer, F. W., and Spencer, T. E. (2003). Identification of genes in the ovine endometrium regulated by interferon tau independent of signal transducer and activator of transcription 1. *Endocrinology* **144**(12), 5203–5214. doi:10.1210/EN.2003-0665
- Klein, C., Bauersachs, S., Ulbrich, S. E., Einspanier, R., Meyer, H. H., Schmidt, S. E., Reichenbach, H. D., Vermehren, M., Sinowatz, F., Blum, H., and Wolf, E. (2006). Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the pre-attachment period. *Biol. Reprod.* **74**(2), 253–264. doi:10.1095/BIOLREPROD.105.046748
- Lee, K. Y., and DeMayo, F. J. (2004). Animal models of implantation. *Reproduction* **128**(6), 679–695. doi:10.1530/REP.1.00340
- Levy, D. E., and Darnell, J. E., Jr (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**(9), 651–662. doi:10.1038/NRM909
- Maj, T., and Chelmonska-Soyta, A. (2007). Pleiotropy and redundancy of STAT proteins in early pregnancy. *Reprod. Domest. Anim.* **42**(4), 343–353. doi:10.1111/J.1439-0531.2006.00787.X

- Mak, I. Y., Brosens, J. J., Christian, M., Hills, F. A., Chamley, L., Regan, L., and White, J. O. (2002). Regulated expression of signal transducer and activator of transcription, Stat5, and its enhancement of PRL expression in human endometrial stromal cells *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**(6), 2581–2588. doi:10.1210/JCEM.87.6.8576
- Mamo, S., Mehta, J. P., Forde, N., McGettigan, P., and Lonergan, P. (2012). Conceptus-endometrium crosstalk during maternal recognition of pregnancy in cattle. *Biol. Reprod.* **87**(1), 1–9. doi:10.1095/BIOLREPROD.112.099945
- Mansouri-Attia, N., Aubert, J., Renaud, P., Giraud-Delville, C., Taghouti, G., Galio, L., Everts, R. E., Degrelle, S., Richard, C., Hue, I., Yang, X., Tian, X. C., Lewin, H. A., Renard, J. P., and Sandra, O. (2009a). Gene expression profiles of bovine caruncular and intercaruncular endometrium at implantation. *Physiol. Genomics* **39**(1), 14–27. doi:10.1152/PHYSIOLGENOMICS.90404.2008
- Mansouri-Attia, N., Sandra, O., Aubert, J., Degrelle, S., Everts, R. E., Giraud-Delville, C., Heyman, Y., Galio, L., Hue, I., Yang, X., Tian, X. C., Lewin, H. A., and Renard, J. P. (2009b). Endometrium as an early sensor of *in vitro* embryo manipulation technologies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**(14), 5687–5692. doi:10.1073/PNAS.0812722106
- Mohr, A., Chatain, N., Dmoszlawski, T., Rinis, N., Sommerauer, M., Vogt, M., and Muller-Newen, G. (2012). Dynamics and non-canonical aspects of JAK/STAT signalling. *Eur. J. Cell Biol.* **91**(6–7), 524–532. doi:10.1016/J.EJCB.2011.09.005
- Nagashima, T., Maruyama, T., Uchida, H., Kajitani, T., Arase, T., Ono, M., Oda, H., Kagami, M., Masuda, H., Nishikawa, S., Asada, H., and Yoshimura, Y. (2008). Activation of SRC kinase and phosphorylation of signal transducer and activator of transcription-5 are required for decidual transformation of human endometrial stromal cells. *Endocrinology* **149**(3), 1227–1234. doi:10.1210/EN.2007-1217
- Nakamura, H., Kimura, T., Koyama, S., Ogita, K., Tsutsui, T., Shimoya, K., Taniguchi, T., Koyama, M., Kaneda, Y., and Murata, Y. (2006). Mouse model of human infertility: transient and local inhibition of endometrial STAT-3 activation results in implantation failure. *FEBS Lett.* **580**(11), 2717–2722. doi:10.1016/J.FEBSLET.2006.04.029
- Oliveira, R., Taghouti, G., Heyman, Y., Hue, I., Sandra, O., Renard, J. P., Guillomot, M., and Lewin, H. A. (2010). Systems biology of mammalian embryo implantation and early placental development. In 'Reproduction in domestic ruminants. Vol. VII. Proceedings of the eighth International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants'. 7th Edn. (Ed(s) M. C. Lucy, J. L. Pate, M. F. Smith and T. E. Spencer.) p. 104. (Nottingham University Press, Nottingham.)
- Popovici, R. M., Betzler, N. K., Krause, M. S., Luo, M., Jauckus, J., Germeyer, A., Bloethner, S., Schlotterer, A., Kumar, R., Strowitzki, T., and von Wolff, M. (2006). Gene expression profiling of human endometrial-trophoblast interaction in a co-culture model. *Endocrinology* **147**(12), 5662–5675. doi:10.1210/EN.2006-0916
- Postel-Vinay, M. C., and Kelly, P. A. (1996). Growth hormone receptor signalling. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* **10**(3), 323–336. doi:10.1016/S0950-351X(96)80455-1
- Rico-Bautista, E., Flores-Morales, A., and Fernandez-Perez, L. (2006). Suppressor of cytokine signalling (SOCS) 2, a protein with multiple functions. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**(6), 431–439. doi:10.1016/J.CYTOGFR.2006.09.008
- Roberts, R. M. (2007). Interferon-tau, a Type I interferon involved in maternal recognition of pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev.* **18**(5–6), 403–408. doi:10.1016/J.CYTOGFR.2007.06.010
- Roberts, R. M., Chen, Y., Ezashi, T., and Walker, A. M. (2008). Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**(2), 170–177. doi:10.1016/J.SEMCDB.2007.10.007
- Sandra, O., Bataillon, I., Roux, P., Martal, J., Charpigny, G., Renaud, P., Bolifraud, P., Germain, G., and Al-Gubory, K. H. (2005). Suppressor of cytokine signalling (SOCS) genes are expressed in the endometrium and regulated by conceptus signals during early pregnancy in the ewe. *J. Mol. Endocrinol.* **34**(3), 637–644. doi:10.1677/JME.1.01667
- Sandra, O., Mansouri-Attia, N., and Lea, R. G. (2012). Novel aspects of endometrial function: a biological sensor of embryo quality and driver of pregnancy success. *Reprod. Fertil. Dev.* **24**(1), 68–79. doi:10.1071/RD11908
- Song, M. M., and Shuai, K. (1998). The suppressor of cytokine signalling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J. Biol. Chem.* **273**(52), 35 056–35 062. doi:10.1074/JBC.273.52.35056
- Spencer, T. E., Johnson, G. A., Bazer, F. W., Burghardt, R. C., and Palmirani, M. (2007). Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod. Fertil. Dev.* **19**(1), 65–78. doi:10.1071/RD06102
- Spencer, T. E., Sandra, O., and Wolf, E. (2008). Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction* **135**(2), 165–179. doi:10.1530/REP-07-0327
- Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H., and Schreiber, R. D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 227–264. doi:10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.67.1.227
- Stewart, M. D., Johnson, G. A., Vyhlidal, C. A., Burghardt, R. C., Safe, S. H., Yu-Lee, L. Y., Bazer, F. W., and Spencer, T. E. (2001). Interferon-tau activates multiple signal transducer and activator of transcription proteins and has complex effects on interferon-responsive gene transcription in ovine endometrial epithelial cells. *Endocrinology* **142**(1), 98–107.
- Stewart, M. D., Choi, Y., Johnson, G. A., Yu-Lee, L. Y., Bazer, F. W., and Spencer, T. E. (2002). Roles of Stat1, Stat2 and interferon regulatory factor-9 (IRF-9) in interferon tau regulation of IRF-1. *Biol. Reprod.* **66**(2), 393–400. doi:10.1095/BIOLREPROD66.2.393
- Talbi, S., Hamilton, A. E., Vo, K. C., Tulac, S., Overgaard, M. T., Dosiou, C., Le Shay, N., Nezhat, C. N., Kempson, R., Lessey, B. A., Nayak, N. R., and Giudice, L. C. (2006). Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* **147**(3), 1097–1121. doi:10.1210/EN.2005-1076
- Teng, C. B., Diao, H. L., Ma, H., Cong, J., Yu, H., Ma, X. H., Xu, L. B., and Yang, Z. M. (2004). Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) expression and activation in rat uterus during early pregnancy. *Reproduction* **128**(2), 197–205. doi:10.1530/REP.1.00053
- Walker, C. G., Meier, S., Littlejohn, M. D., Lehnert, K., Roche, J. R., and Mitchell, M. D. (2010). Modulation of the maternal immune system by the pre-implantation embryo. *BMC Genomics* **11**, 474. doi:10.1186/1471-2164-11-474
- Wooding, F. B., Morgan, G., Forsyth, I. A., Butcher, G., Hutchings, A., Billingsley, S. A., and Gluckman, P. D. (1992). Light and electron microscopic studies of cellular localisation of oPL with monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* **40**(7), 1001–1009. doi:10.1177/40.7.1607634
- Yoshimura, A., Naka, T., and Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* **7**(6), 454–465. doi:10.1038/NRI2093

***FOXL2* is a P4 target gene
in the ruminant endometrium**

C. Eozenou, A. Lesage-Padilla, M. Pannetier, V. Mauffré, S. Camous, G. D. Healey, P. Bolifraud, C. Giraud Delville, D. Vaiman, T. Shimizu, A. Miyamoto, I. M. Sheldon, F. Constant and O. Sandra

To be submitted.

FOXL2 is a P4 target gene in the ruminant endometrium

Caroline Eozenou^{1,2}, Audrey Lesage^{1,2}, Maëlle Pannetier^{1,2}, Vincent Mauffré^{1,2}, Sylvaine Camous^{1,2}, Gareth Healey³, Philippe Bolifraud^{1,2}, Corinne Giraud-Delville^{1,2}, Daniel Vaiman, Takashi Shimizu⁴, Akio Miyamoto⁴, I. Martin Sheldon³, Fabienne Constant^{1,2} and Olivier Sandra^{1,2,*}

¹INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78352 Jouy-en-Josas, France;

²ENVA, F-94704 Maisons Alfort, France;

³Centre for Reproductive Immunology, Institute of Life Science, College of Medicine, Swansea University, Swansea, SA2 8PP, UK

⁴Graduate School of Animal and Food Hygiene, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Japan.

Running title: FOXL2, P4 and ruminant endometrium

Summary sentence: FOXL2 is expressed and regulated by P4 in both ovine and bovine endometrium; this *in vitro* regulation occurs directly through its nuclear receptor.

Keywords: FOXL2, endometrium, sheep, cattle, progesterone

***Correspondence and Reprint Requests:** Olivier Sandra, INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78352 Jouy-en-Josas, France ; ENVA, F-94704 Maisons Alfort, France. Email: olivier.sandra@jouy.inra.fr, Phone: +33134642343.

ABSTRACT

FOXL2 -a member of the FOXL sub-class and a key transcription factor for ovarian differentiation- is regulated during early pregnancy in bovine endometrium. Interferon-Tau did not regulate *FOXL2* gene expression but the impact of ovarian steroids was not investigated. In the present study, we analysed the contribution of steroids hormones in the regulation of *FOXL2* gene expression in ruminants using physiological and experimental models derived from cattle and sheep. In sheep, we confirmed that *FOXL2* mRNA and protein are expressed in the ovine endometrium across the oestrous cycle (day 4 to day 15 post-oestrus (dpo)). In keeping with our former report in bovine endometrium, ovine *FOXL2* endometrial expression was low during the luteal phase of oestrous cycle (day 4 to 12 post-oestrus) and at implantation (15 dpo) while mRNA and protein expression significantly increased during the luteolytic phase (day 15 post-oestrus in cycle). In pregnant ewes, inhibition of progesterone production (P4) by trilostane (an inhibitor of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase activity) during the 5-16 dpo period prevented P4 rise and led to a significant increase of *FOXL2* transcript expression in caruncles compared to the control group (1.4-fold, $P < 0.05$). Ovariectomized ewes or cows supplemented with exogenous P4 for 12 days or 6 days respectively exhibited a significant inhibition of endometrial *FOXL2* gene expression compared to control ovariectomized females (sheep, mRNA, 1.8-fold; protein, 2.4-fold; cattle; mRNA, 2.2-fold; $P < 0.05$). Exogenous 17β -estradiol (E2) treatment for 12 days in sheep or 2 days in cattle did not affect *FOXL2* endometrial expression compared to control ovariectomized females. Moreover, bovine endometrial explants cultivated for 48 hours with exogenous P4 were shown to decrease *FOXL2* expression. In contrast with data reported in mammalian ovary, *FOXL2* gene expression does not appear to be E2-dependant in the endometrium. *In vitro* assays using COS7 cells have demonstrated that P4 can directly regulate *FOXL2* promoter activity through its nuclear receptor. Collectively, our current finding in ruminant, human database and the literature suggest *FOXL2* is a direct target of P4 and is mandatory for female reproduction through the evolution process.

INTRODUCTION

In mammals, successful pregnancy is characterized by a tightly regulated cross-talk between the endometrium and the conceptus (embryonic disk and extra-embryonic tissues) that takes place during the peri-implantation period (Lee and DeMayo 2004; Bazer et al. 2010; Spencer and Hansen, 2015). By affecting the endometrial function during this period, environmental factors including infections, stress, nutrition or endocrine disruptors can alter the interactions with the conceptus leading to early pregnancy failures or altered progression of pregnancy to term and impact the adult health (Sandra et al. 2011). In cattle and more specifically in dairy cows, two thirds of pregnancies abort very prematurely as a consequence of early embryonic death (Diskin and Morris 2008). Therefore, peri-implantation period is a critical checkpoint for the progression as well as the outcome of pregnancy (Bazer et al. 2010; Sandra et al. 2011) and prompts the need for accurately defining the molecular mechanisms involved during this period.

Luteal phase of oestrous and menstrual cycles is associated with the organisation of endometrial receptivity, a prerequisite for embryo implantation. The receptive status of the endometrium requires combined actions of gonadal steroid hormones, oestrogen or oestradiol (E2) and progesterone (P4, Miller and Moore 1976; Devroey and Pados 1998; Al-Gubory et al. 2008; Ozturk and Demir 2010). Oestrogen is secreted during the follicular phase that covers a short period of time in ruminants 4 to 5 days in cattle (Forde et al. 2011) compared to the long follicular phase described in humans (14 days, Hawkins and Matzuk 2008; Mihm et al. 2011). In ruminants, the short-time secretion of E2 is associated with the absence of endometrial growth (Forde et al. 2011) and synepitheliochorial implantation whereas these steroids regulate proliferation and growth of endometrial cells during the follicular phase to allow the deep invasion of human conceptus when pregnancy occurs (Hawkins and Matzuk 2008; Mihm et al. 2011). Uterine receptivity requires the pleiotropic actions of P4, produced by the corpus luteum and required in mammals for the maternal support of conceptus survival and elongation (Spencer et al. 2008; Bazer et al. 2012). Unlike

human and rodents species, decidualisation does not occur in ruminants (Lee and DeMayo 2004) leading to a synepitheliochorial implantation associated with a superficial invasion of the conceptus (Lee and DeMayo 2004).

Progesterone controls the endometrial gland differentiation and secretion (histotroph; Lonergan 2011) as well as endometrial angiogenesis (Bazer et al. 2009). P4 has been shown to be permissive to interferon-tau (IFNT) actions, prior to conceptus implantation (Spencer et al. 2004 ; Spencer and Hansen, 2015). IFNT is produced by the trophoctoderm of elongated conceptus and this factor is the major signal of pregnancy maternal recognition in ruminants (Martal et al. 1979; Roberts et al. 2008; Spencer et al. 2008). IFNT acts on the endometrium to prevent development of the luteolytic mechanism and to establish the pregnancy in ruminants (Bott *et al.*, 2010; Bazer et al. 2012). The combine biological action of P4 and IFNT are mandatory for pregnancy outcome and prompt the need for deciphering their complete actions on endometrial physiology.

In the last decade, microarrays and RNA-sequencing analyses in ruminant endometrium have allowed a genome-wide understanding of endometrial genes involved in endometrial physiology during oestrous cycle and early pregnancy up to implantation (Bauersachs et al. 2008; Satterfield et al. 2009; Bauersachs and Wolf 2012; Ulbrich et al. 2012). Using bovine endometrium at 20 days of oestrous cycle (that corresponds to the follicular phase) and pregnancy (Day of implantation), transcriptional regulation of various families of transcription factors was unveiled including several members of the winged-helix/forkhead domain (FOX) transcription factors family (Mansouri-Attia et al. 2009). Based on these data, we further confirmed the endometrial expression of *FOXL2* (Eozenou et al. 2012), a key gene involved in ovarian differentiation and maintenance of ovarian function from foetal life to adulthood (Pannetier and Pailhoux 2011; Georges et al. 2013). Our previous study demonstrated that IFNT had no effect on *FOXL2* expression whereas high P4 circulating level observed during the luteal phase of oestrous cycle and early pregnancy appeared to be negatively correlated with *FOXL2* endometrial expression (Eozenou et al. 2012). The present study aims to

decipher the mechanisms of *FOXL2* expression by ovarian steroid hormone balance in the endometrium of ruminants using physiological situations, *in vivo* experimental models and *in vitro* approaches.

MATERIALS AND METHODS

Animal and cell cultures

All experiments were conducted in accordance with the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, as promulgated by the Society for the Study of Reproduction and approved by the French Ministry of Agriculture according to French regulations for animal experimentation (authorization no. 78-34).

Experiment 1: *FOXL2* expression during the oestrous cycle and at implantation in ovine endometrium.

Cyclic and pregnant ewes of the Préalpes-du-Sud breed were synchronized and treated as previously published (Al-Gubory et al. 2006). Twelve ewes were randomly allocated to three groups (n = 4 ewes per group) such as day 4, day 8 and day 12 of the oestrous cycle (respectively early, mid and active luteal phase). Eight additional ewes were randomly allocated to two groups (n = 4 ewes per group): day 15 of the oestrous cycle and pregnancy (respectively to the late luteal phase/follicular phase and implantation day). Uteri were collected, flushed and stage of pregnancy was confirmed by the presence and the morphology of the conceptus in uterine flushings (Degrelle et al. 2005). Endometrial caruncular (CAR) and intercaruncular (ICAR) areas were immediately dissected from the uterine horns ipsilateral to the corpus luteum as previously described (Sandra *et al.*, 2005).

Experiment 2: Impact of a reduced progesterone concentration on *FOXL2* endometrial expression in the sheep.

Seventeen ewes received either subcutaneous injections of DMSO (n = 7) or Trilostane (n = 10) as previously described (abstract, Soleno *et al.*, 2008). Trilostane (15 mg/ewe in 1 ml DMSO) or DMSO was injected every 12 h (08:00 AM and PM) to the ewes from day 6 to day

16 (only at 08:00 AM). Endometrial tissues and concepti were collected as described in experience 2.

Experiment 3: Impact of steroidal hormones supplementation on *FOXL2* endometrial expression.

Ovaries ablations and replacement of steroids were carried out in sheep and cattle.

Ovine model

Sixteen ewes of the Préalpes-du-Sud breed were ovariectomized (OVX) as previously described (Al-Gubory et al. 2008). At forty-two days after ovariectomy, all ewes were randomly allocated to four groups (n = 4 ewes per group): control ewes (OVX), E2-treated (OVX + E2), P4-treated (OVX + P4), and E2/P4-treated (OVX + E2 + P4) ewes as published (Al-Gubory et al. 2008). This steroid hormone administration protocol has been shown to produce physiological blood concentrations of E2 and P4 (Beard et al. 1994) corresponding to those during the follicular and luteal phases in intact cyclic ewes (Pant et al. 1977). All steroid hormones treatment were administrated in 1 ml of 90% corn oil: 10% ethyl alcohol at intervals of 8 h by intramuscular injection as previously published (Al-Gubory et al. 2008). Blood (monitoring steroid hormone level) and endometrial tissue (CAR and ICAR areas) were collected and treated as described (Al-Gubory et al. 2008).

Bovine model

Twelve Holstein cows (3-7 year of age) were ovariectomized (OVX) and after fifty days randomly divided into four groups as previously published (Shimizu et al. 2010), the OVX group (n=3, saline solution), OVX + E2 group (n=3, estrogens treatment), OVX + P4 group (n=3, progesterone treatment) and OVX + E2+P4 group (n=3, combination of estrogens and progesterone treatment). Blood and endometrial tissue (ICAR area) were collected after steroid treatment as reported previously (Shimizu et al. 2010).

Bovine endometrial explants

Endometrial explants were dissected from ICAR areas from two cows in the late oestrus stage using a sterile 8-mm punch biopsy and cultured *ex vivo* with control media, E2 media (3pg/ml) and P4 media (5ng/ml) for 48 hours (Borges *et al.*, 2012). Explants were then stored at -80°C in TRIZOL reagent prior to RNA extraction.

Cell culture conditions and transfections assays

COS7 cells (Public Health England, Salisbury, UK) were cultivated in phenol-red free Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM)-F12 (Sigma, Saint-Louis, USA) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 2.52 mM L-glutamine (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany), 430-16.4-15.8 nM Insuline-Transferin-Selenium (ITS, Sigma, Saint-Louis, USA), 100 UI/ml- 340 nM Penicillin-Streptomycine (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany), 100 UI/ml Nystatine (Sigma, Saint-Louis, USA), 2.7 µM Amphotericine B (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) and 104.7 µM Gentamicyne (Sigma, Saint-Louis, USA). Cells were maintained in 37°C humidified incubator at 5% CO₂.

Progesterone Receptor (PR) -A and -B expressing plasmids, cloned in pSG5 plasmid, were kindly provided by P. Chambon (INSERM, Institut de Chimie Biologique, Faculté de Médecine de Strasbourg, France; Kastner *et al.*, 1990).

Cells were plated at a density of 100 000 cells/well on 24-well plates and were allowed to grow till 90% confluency. After 24h of steroid deprivation, cells were transfected using 500 ng caprine sequence of FOXL2 promoter cloned in pGL3b vector (1kb proximal promoter, Pannetier *et al.*, 2005 and 2006), 250 ng pSG5, 250 ng PRA, 250 ng PRB or 250 ng PRA+PRB (125ng each), and 10 ng TK-Renillia (internal control for normalisation, Promega Madison, USA) using 1 µl/well XtremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche applied science, Mannheim, Germany). After 24 hours of transfection, media was replaced with fresh complete media with 0.03% ethanol (vehicle) or 100 nM progesterone for another 24 hours. Luciferase assays were performed with the Promega Dual-Luciferase Reporter Assay System following manufacturer's protocol using the injector Tristar LB941 (Berthold

Technologies, Bad Wildbad, Germany) and as previously published in Pannetier *et al.*, 2005 and 2006. Each combination of plasmids was tested in duplicate and in three independent experiments.

Tissue and Cell Collection and RNA Extraction

Endometrial samples were immediately snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C prior to analysis (Eozenou *et al.* 2012). Total RNA from frozen tissue and explants (Borges *et al.*, 2012) was isolated by homogenization using Trizol Reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and purified as published (Eozenou *et al.* 2012).

Real-time RT-PCR

Total RNA samples were used for real-time RT-PCR (RT-qPCR). One µg of total RNA were reverse transcribed into cDNA as previously described (Eozenou *et al.* 2012). Primers (Eurogentec, Liège, Belgium) were designed (Primer Express Software v2.0, Applied Biosystems) to specifically amplified bovine and ovine *FOXL2* (F – CCGGCATCTACCAGTACATTATAGC; R – GCACTCGTTGAGGCTGAGGT; NCBI sequence reference: NM_001031750.1) and *RPL19* (F – CCCCAATGAGACCAATGAAATC; R – CAGCCCATCTTTGATCAGCTT, Mansouri-Attia *et al.* 2009). Amplified *FOXL2* and *RPL19* PCR fragments were sequenced to assess the amplification of the correct fragment. According to the relative standard curve method (Larionov *et al.* 2005), the relative quantification of mRNA amount of *FOXL2* against the normalizer gene *RPL19* was calculated.

Western Blot Analysis

Total proteins were extracted from frozen tissue as previously published (Eozenou *et al.* 2012).

Western blot immunoassays were processed with 15 µg of total protein extract as previously described (Eozenou *et al.* 2012), using a rabbit anti-FOXL2 purified antibody generated against a peptide corresponding to the C-terminal conserved region of mammalian FOXL2

(WDHDSKTGALHSRLDL, diluted 1:500, CASLO Laboratory, Denmark) in PBS-T solution containing 4% nonfat dry milk and then, a goat peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (diluted 1:5 000, SantaCruz Biotechnology; Heidelberg, Germany). Actin B (ACTB) was assessed as a loading control, using a mouse monoclonal anti-ACTB antibody (diluted 1:2 000, Sigma-Aldrich, France) and goat peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody (SantaCruz Biotechnology; Heidelberg, Germany; diluted 1:5 000). Immunoreaction signals were revealed with Luminata Classico HRP Substrates (Millipore, Guyancourt, France) and analysed using an image analysis system (Advanced Image Data Analyser Software, LAS 1000 camera; Fujifilm, FVST, Courbevoie, France).

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 4 software (GraphPad Software, USA). Quantitative data were subjected to a two-way-ANOVA followed by Bonferroni test. Data were analysed for effects of day, pregnancy status (cyclic or pregnant), treatments (DMSO and Trilostane; E2, P4 and E2+P4) endometrial areas (CAR and ICAR) and their interactions (day *versus* status or status *versus* endometrial areas). Linear regression analysis was used to correlate circulating P4 concentrations with FOXL2 protein expression.

RESULTS

FOXL2 gene is expressed in the ovine endometrium

In sheep, the oestrous cycle lasts 15-17 days and is associated with an increase in P4 secretion (day 5-6) that reaches a plateau before decreasing (day 14-15) in association with corpus luteum regression (Forde and Lonergan, 2012).

In the ovine endometrium, *FOXL2* transcript and protein were expressed in endometrial caruncular (CAR) and intercaruncular (ICAR) areas during the oestrous cycle and at the initiation of implantation (Fig. 1). Endometrial *FOXL2* gene expression was significantly higher in CAR areas than in ICAR areas (Fig.1 A and B, 3-fold; $P < 0.001$). *FOXL2*

expression was significantly higher during the early luteal phase (day 4, 1.5-fold) and the follicular phase (day 15, 2-fold) of the oestrous cycle compared to the mid (day 8) and active (day 12) luteal phase of the oestrous cycle and the implantation (day 15) step especially in the CAR area ($P < 0.05$). In western blot analysis, FOXL2 protein was detectable at 50 kDa as we previously reported in the bovine specie (Eozenou et al. 2012).

Since endometrial FOXL2 gene expression decrease when P4 circulating level were increased, two ovine experimental models were derived to further analyse the impact of P4 on FOXL2 endometrial expression.

Alteration of P4 blood level affects FOXL2 gene expression in the ovine endometrium

Two groups of pregnant ewes were treated with either a DMSO solution (control group) or a solution of Trilostane, an inhibitor of the 3β -hydroxysteroid-deshydrogenase that catalyses the conversion of pregnenolone into progesterone. Trilostane treatment was applied from day 6 to day 16 of pregnancy preventing P4 rise during the early luteal phase with a steady level of circulating P4 during early pregnancy (Fig. 2; Camous *et al.*, **submitted**). Compared to the control group, FOXL2 mRNA expression was significantly higher in CAR area at 16 dpo of pregnancy in the Trilostane treated group (Fig. 2A; 1.4-fold, $P < 0.05$). At the protein level, a trend toward an increase FOXL2 expression was observed in the CAR areas due to the trilostane injection (Fig. 2B, $P = 0.14$).

In order to mimic the ovarian oestrous cycle, ovariectomized ewes were supplemented for 12 days with control solution (control group) or ovarian steroid solutions: P4, E2 and a combination of both. A group of cyclic ewes at 12 dpo was added to the experimental design in order to determine the effect of the ovariectomy on endometrial genes expression (Al-Gubory et al. 2006). FOXL2 gene was expressed in every experimental condition with a significant decrease in the ICAR area compared to the CAR areas (Fig. 3; transcript and protein, $P < 0.05$). The absence of the ovary led to a significant higher FOXL2 expression in the OVX ewes compared to the cyclic group. E2 supplementation did not significantly alter

FOXL2 mRNA expression compared to the OVX group (Fig. 3A), but stimulated *FOXL2* protein expression in the ICAR area (Fig. 3B; 2.5-fold, $P < 0.05$). P4 supplementation significantly down-regulated *FOXL2* gene expression (transcript: CAR and ICAR area; and protein: CAR only; $p < 0.05$). On OVX supplemented with [P4 + E2], *FOXL2* gene expression did not significantly differ from the OVX, [E2], [P4] and cyclic groups.

P4 inhibits endometrial FOXL2 gene expression in cattle

Ovariectomized cows were supplemented with E2, P4 or both ovarian steroids as published (Shimizu et al. 2010). As in the ovine OVX model, a significant decrease of *FOXL2* endometrial mRNA level was detected in [P4] and [P4+E2] supplemented cows compared to the OVX group (Fig. 4A, 2-fold, $P < 0.05$). E2 supplementation has no significant impact on endometrial *FOXL2* transcript compared to OVX cows.

In bovine endometrial explants incubated with [E2], [P4] and control media for 48 hours a significant decrease of *FOXL2* mRNA level expression was observed following P4 supplementation compared to the control treatment whereas E2 treatment had no effect (Fig. 4B, 2-fold, $P < 0.05$). *PGR* transcript exhibits the same pattern of expression; P4 supplementation induced a significant decrease of *PGR* expression compared to E2 supplementation (Fig X, 2.5-fold, $P < 0.05$).

P4 directly regulates the activity of FOXL2 promoter through its nuclear receptor

In COS7 cells, the activity of *FOXL2* promoter remains steady between control condition and P4 treatment alone or *PGR* over-expressions alone. Then, association of P4 treatment and *PGR* genes over-expression lead to a significant increase of the activity of *FOXL2* promoter (Fig. 5, $P < 0,001$).

DISCUSSION

Since its cloning and isolation in 2001, *FOXL2* has been recognized to be a key factor in ovarian differentiation and the maintenance of ovarian function from foetal life to adulthood (Crisponi et al. 2001; Uhlenhaut et al. 2009; Pannetier and Pailhoux 2011; Uhlenhaut and Treier 2011). We demonstrated that *FOXL2* was expressed and regulated throughout oestrous cycle and early pregnancy in bovine endometrium, independently of the production of the conceptus-derived IFNT, the major signal of pregnancy maternal recognition in ruminants (Eozenou et al. 2012). In this present study, we have demonstrated that (i) *FOXL2* gene expression is regulated throughout oestrous cycle and at implantation in ovine endometrium; (ii) P4 affects endometrial expression of *FOXL2* in cattle and in sheep and (iii) P4 regulates directly *FOXL2* promoter activity through the activation of its nuclear receptor, PGR.

In bovine and ovine endometrium, high and low P4 circulating levels led to a significant decrease and increase of *FOXL2* gene expression, respectively. In addition, ovariectomized animals exhibited a clear drop of *FOXL2* expression under the supplementation of P4 as well as in endometrial explants incubated for 48 hours with [P4] medium. Ovariectomized animals and bovine endometrial explants provide us an accurate demonstration of P4 action on *FOXL2* endometrial expression regardless of the secretion of ovaries as well as the autocrine and paracrine regulations occurring in the endometrium preventing the putative compensatory effects of both ovaries and endometrium. Our results have demonstrated P4 counteracts systematically E2 effect on *FOXL2* endometrial gene expression in ruminants. Collectively, our data suggest strongly that P4 is a master regulator of *FOXL2* endometrial expression. P4 primarily acts through their nuclear receptors that are involved in uterine receptivity and embryo implantation (Lydon et al. 1995; Franco et al. 2008). Analysis of ovine and bovine *FOXL2* promoter sequence exhibited the presence of Progesterone Receptor response Element (PRE, data not shown) suggesting P4 could regulate *FOXL2* gene expression using its nuclear receptor. Besides, our experiment in COS7 cells exhibits the fact

that FOXL2 promoter activity is directly regulated by P4 nuclear receptor (PGR, form A and B) associated with P4 supplementation. Altogether, our data evidence FOXL2 is a direct target gene of P4 *in vitro*.

PGR are localized in luminal and glandular epithelia as well as stroma in bovine endometrium (Okumu et al. 2010). Its sub-cellular localization is clearly nuclear during follicular/early luteal phase of the oestrous cycle and early pregnancy (5 dpo) and staining intensity of nuclear PGR decreased throughout luteal phase then was completely absent from luminal and glandular epithelia during the active luteal phase (16 dpo; Okumu et al. 2010). FOXL2 protein which is localized in the nuclei of endometrial stroma and glandular epithelium during the follicular phase (20 dpo) was shown to disappear from the nuclei of glandular epithelium during the active luteal phase as well (14 dpo; Eozenou et al. 2012). Therefore, the literature and our published data reported in bovine endometrium suggest FOXL2 and PGR proteins displayed the same pattern of cell distribution throughout oestrous cycle. Thus, we hypothesized PGR could stimulate FOXL2 gene expression in endometrial stroma and glandular epithelium binding its PRE on FOXL2 promoter. In addition, we suggested also P4 repressed FOXL2 gene expression as a consequence of PGR gene repression. However, there is a discrepancy between our experiment in COS7 cells and our hypothesis. In COS7 cells, PGR can stimulate FOXL2 promoter activity only when P4 supplementation is associated with. Because COS7 cells are naïve cell line, they are very useful and convenient for transient transfection and functional analysis. But this line is considered as a monkey fibroblast-like cell line, which has nothing in common with bovine endometrial cells. Cellular morphologies are different, pathways are different and co-factors expression is different meaning an *in vivo* regulation process could be observed in COS7 cells but this is not the appropriate microenvironment to observe a clear activation or inhibition. In this way, there is a need for more detailed experiments using primary bovine endometrial cells and transient transfection. Moreover, many rapid and non-classical action of P4 is mediated by its Progesterone Receptor Membrane component 1 and 2 (PGRMC1

and 2, Pru and Clark 2013). Further *in vitro* investigations will enable us to identify the mechanism of P4 direct action using its receptor on *FOXL2* endometrial gene expression.

In mammals, uterine receptivity is mandatory for the progression of pregnancy and characterized by intensive endometrial cell proliferation mediated by E2 during the follicular phase and endometrial gland maturation, changes in endometrial genes expression and decidualisation when this step occurs; mediated by P4 during the luteal phase (Miller and Moore 1976; Devroey and Pados 1998; Ozturk and Demir 2010; Spencer and Bazer 2002; Al-Gubory et al. 2008; Spencer et al. 2012). In ruminants, oestrous cycle is characterized by a short follicular phase and a long luteal phase (Forde et al. 2011) where *FOXL2* gene expression was shown to be, respectively, increased and decreased, in both sheep and cattle (Eozenou et al. 2012). Interestingly, in women, where the menstrual cycle is characterized by a long follicular and luteal phase (Hawkins and Matzuk 2008; Mihm et al. 2011), *FOXL2* transcript expression appears to be similar to its expression in bovine and ovine endometrium with a significant higher expression during the follicular phase (Talbi et al. 2005). Our data and the literature suggest *FOXL2* gene that is expressed during the follicular phase of three mammal species could be a key regulator of the proliferative process of the uterine receptivity. With a short follicular phase, endometrial proliferation is superficial in ruminant leading then to a non-invasive implantation while women or mice have a longer follicular phase and an extensive endometrial proliferation leading to an invasive implantation with decidualization of stroma To put it in a nutshell, data suggest that the longer *FOXL2* expression is, the longer follicular (proliferative) phase and the most invasive implantation are observed. Further investigations about *FOXL2* endometrial expression will be needed to confirm this hypothesis regarding to the length of follicular period In the ovarian context, *FOXL2* is known to be a master gene in apoptosis regulation (Batista et al. 2007; Caburet et al. 2012). Indeed, the wild-type *FOXL2* gene is considered as a tumour suppressor gene (Benayoun et al. 2011). Conversely, the *FOXL2* (C402G) mutation is involved in adult and juvenile granulosa cell tumours with a poor survival and disease-free survival rate (D'Angelo

et al. 2011). Nevertheless, *FOXL2* is involved in the pro-apoptotic process regulating the expression of *BCL2A1* and *ATF3* genes but also the anti-apoptotic process regulating the expression of *TNFAIP3*, *NR5A2* and *FOS* genes in granulosa cells (Batista et al. 2007; Moumne et al. 2008). We can hypothesize that *FOXL2* could play a critical role in the pro- and anti-apoptotic balance during the follicular phase regulating the proliferation of endometrial cells depending on the length of the follicular phase. Further analyses will be necessary to evaluate the expression of pro- and anti-apoptotic genes in ruminant endometrium to confirm the implication of *FOXL2* in the proliferative process of mammal follicular phase in the endometrium. In addition, in case of BPES syndrome, women are infertile caused by premature ovarian failure (Crisponi et al. 2001; Verdin and De Baere 2012). Those women could have access to medically assisted procreation to rescue ovarian infertility but in the endometrial context, are they able to be pregnant and able to maintain this pregnancy until parturition? Further analyses will be necessary to better understand the implication of *FOXL2* in mammal endometrial physiology including in BPES syndrome.

Gonadal steroid hormones act as the critical trophic factors necessary for the normal development of many biological systems (Nugent et al. 2012). E2 plays an essential role in female sex determination in non-mammalian vertebrates regardless of the sex determining mechanism (Pask et al. 2010). In mammalian vertebrates, E2 has also a highly conserved role but it is not required for initial ovarian development in mice (Pask 2012). Indeed, alpha and beta estrogen receptors (*Esr1* and 2) knock-out and *Cyp19/Aromatase* knockout mice have normal early ovarian differentiation (Lubahn et al. 1993; Krege et al. 1998; Britt et al. 2001; Britt and Findlay 2003). However, shortly after birth, granulosa cell fate cannot be maintained and initiate the transdifferentiation to the sertoli cell fate (Lubahn et al. 1993; Krege et al. 1998; Britt et al. 2001; Britt and Findlay 2003). E2 is one of the key modulator of the maintenance of ovarian differentiation throughout the adulthood. In the context of a functional ovary, E2 binds its nuclear receptor, leading to activated *Esr* and act with *Foxl2* to suppress *Sox9* transcription binding directly the *Sox9* enhancer, TESCO element (Uhlenhaut

et al. 2009). In the other hand, *FOXL2* is also known to stimulate the *CYP19* gene expression, leading to an increase of E2 production (Pannetier et al. 2006). To conclude, E2 and *FOXL2* are essential for the ovarian biological functions including the ovulation process. Progesterone is the pregnancy hormone in all mammals allowing more particularly, the conceptus implantation (Bazer et al. 2010). In the case of the ovariectomized ewes and cows and the bovine endometrial explants, only P4 action induces a clear down-regulation of *FOXL2* expression. Conversely, *FOXL2* is up-regulated when P4 production and secretion remains almost constant at a low circulating level. Our data suggest that P4 is one of the most important regulators of *FOXL2* gene in the endometrial context. The literature and our results exhibit the fact that *FOXL2* is expressed in mammalian ovary and endometrium and is regulated by E2 and P4 respectively in a tissue-specific-manner.

Similarly to the situation we reported in bovine endometrium (Eozenou et al. 2012), *FOXL2* expression in ovine endometrium was inhibited throughout luteal phase (from day 8 to day 12) but increased during the follicular phase (4 dpo and 15 dpo) of the oestrous cycle. Ruminant endometrium is separated in two morphologically distinct areas, the CAR and ICAR areas and exhibits a significant decrease of *FOXL2* expression in the ICAR area. As previously published (Eozenou et al. 2012) and described above, *FOXL2* protein is mostly localized in the nuclei of endometrial stroma and glandular epithelium during the follicular phase and completely absent in the luminal epithelial cells. These data suggest that *FOXL2* gene expression has to be lowered in the ICAR area which is the glandular area, if not, we hypothesized that *FOXL2* would have deleterious effects on endometrial gland differentiation and histotroph secretion which are mandatory processes prior to the establishment of pregnancy and later, implantation (Bazer et al. 2010). Moreover, when the P4 circulating level exceeds a certain threshold, *FOXL2* has to be lowered in CAR area as well, which is the aglandular area. In conclusion, during the luteal phase or the pregnancy maternal recognition period in ruminant endometrium, *FOXL2* expression is low in both endometrial areas suggesting the repression occurring during the luteal phase and the early pregnancy is

a prerequisite for uterine receptivity then implantation processes. In the last decade, *FOXL2* gene had been considered as the gatekeeper of ovarian identity in numerous species due to its highly conserved protein sequence including non-vertebrate and vertebrate species (Geraldo *et al.*, 2013). As a consequence of the evolution, new tissues appeared in vertebrate species such as uterus, placenta or mammary gland. Collectively, our data as well as GEOprofile and NextProt-Beta data had exhibited the expression of *FOXL2* in every reproduction-related tissue: endometrium, myometrium, mammary gland, placenta, oviduct and central nervous system. With the evolution and the apparition of new tissues, *FOXL2* gene appears to be conserved in female reproductive tract of mammalian species. Further investigations will be required to investigate if *FOXL2* is the gatekeeper of female reproduction.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to E. Pailhoux and A. Vitorino Carvalho (INRA, Jouy-en-Josas, France) for continuous support and helpful discussions. We thank L. Gall (Western Blot facilities), P. Reinaud (INRA, Jouy-en-Josas, France), MC. Aubrière (INRA, Jouy-en-Josas, France), JP. Albert (Experimental unit of INRA, Jouy-en-Josas, France), ICE Platform (Agilent Analyzer, INRA) and technical staff of the Institute of Life Science at Swansea University (United-Kingdom). Financial support was provided by ANR-08-GENM-037. CE is a recipient of INRA-Phase Department and ANR-08-GENM-037.

REFERENCES

- Al-Gubory, K. H., P. Bolifraud and C. Garrel (2008). "Regulation of Key Antioxidant Enzymatic Systems in the Sheep Endometrium by Ovarian Steroids." *Endocrinology* **149**(9): 4428-4434.
- Al-Gubory, K. H., S. Camous, G. Germain, P. Bolifraud, A. Nicole and I. Ceballos-Picot (2006). "Reconsideration of the proposed luteotropic and luteoprotective actions of ovine placental lactogen in sheep: in vivo and in vitro studies." *The Journal of endocrinology* **188**(3): 559-568.
- Batista, F., D. Vaiman, J. Dausset, M. Fellous and R. A. Veitia (2007). "Potential targets of *FOXL2*, a transcription factor involved in craniofacial and follicular development,

- identified by transcriptomics." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(9): 3330-3335.
- Bauersachs, S., K. Mitko, S. E. Ulbrich, H. Blum and E. Wolf (2008). "Transcriptome studies of bovine endometrium reveal molecular profiles characteristic for specific stages of estrous cycle and early pregnancy." Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association **116**(7): 371-384.
- Bauersachs, S. and E. Wolf (2012). "Transcriptome analyses of bovine, porcine and equine endometrium during the pre-implantation phase." Animal reproduction science **134**(1-2): 84-94.
- Bazer, F. W., J. Kim, G. Song, H. Ka, C. D. Tekwe and G. Wu (2012). "Select nutrients, progesterone, and interferon tau affect conceptus metabolism and development." Annals of the New York Academy of Sciences **1271**: 88-96.
- Bazer, F. W., T. E. Spencer, G. A. Johnson, R. C. Burghardt and G. Wu (2009). "Comparative aspects of implantation." Reproduction **138**(2): 195-209.
- Bazer, F. W., G. Wu, T. E. Spencer, G. A. Johnson, R. C. Burghardt and K. Bayless (2010). "Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals." Mol Hum Reprod **16**(3): 135-152.
- Beard, A. P., M. G. Hunter and G. E. Lamming (1994). "Quantitative control of oxytocin-induced PGF2 alpha release by progesterone and oestradiol in ewes." Journal of reproduction and fertility **100**(1): 143-150.
- Benayoun, B. A., S. Caburet and R. A. Veitia (2011). "Forkhead transcription factors: key players in health and disease." Trends in genetics : TIG **27**(6): 224-232.
- Britt, K. L., A. E. Drummond, M. Dyson, N. G. Wreford, M. E. Jones, E. R. Simpson and J. K. Findlay (2001). "The ovarian phenotype of the aromatase knockout (ArKO) mouse." The Journal of steroid biochemistry and molecular biology **79**(1-5): 181-185.
- Britt, K. L. and J. K. Findlay (2003). "Regulation of the phenotype of ovarian somatic cells by estrogen." Molecular and Cellular Endocrinology **202**(1-2): 11-17.
- Caburet, S., A. Georges, D. L'Hote, A. L. Todeschini, B. A. Benayoun and R. A. Veitia (2012). "The transcription factor FOXL2: at the crossroads of ovarian physiology and pathology." Molecular and Cellular Endocrinology **356**(1-2): 55-64.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.
- Crisponi, L., M. Deiana, A. Loi, F. Chiappe, M. Uda, P. Amati, L. Bisceglia, L. Zelante, R. Nagaraja, S. Porcu, M. S. Ristaldi, R. Marzella, M. Rocchi, M. Nicolino, A. Lienhardt-Roussie, A. Nivelon, A. Verloes, D. Schlessinger, P. Gasparini, D. Bonneau, A. Cao and G. Pilia (2001). "The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome." Nat Genet **27**(2): 159-166.
- D'Angelo, E., A. Mozos, D. Nakayama, I. Espinosa, L. Catusus, J. Munoz and J. Prat (2011). "Prognostic significance of FOXL2 mutation and mRNA expression in adult and juvenile granulosa cell tumors of the ovary." Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc **24**(10): 1360-1367.
- Degrelle, S. A., E. Champion, C. Cabau, F. Piumi, P. Reinaud, C. Richard, J. P. Renard and I. Hue (2005). "Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts." Dev Biol **288**(2): 448-460.
- Devroey, P. and G. Pados (1998). "Preparation of endometrium for egg donation." Human reproduction update **4**(6): 856-861.
- Diskin, M. G. and D. G. Morris (2008). "Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants." Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene **43 Suppl 2**: 260-267.
- Eozenou, C., A. Vitorino Carvalho, N. Forde, C. Giraud-Delville, L. Gall, P. Lonergan, A. Auguste, G. Charpigny, C. Richard, M. Pannetier and O. Sandra (2012). "FOXL2 is regulated during the bovine estrous cycle and its expression in the endometrium is independent of conceptus-derived interferon tau." Biology of Reproduction.

- Forde, N., M. E. Beltman, P. Lonergan, M. Diskin, J. F. Roche and M. A. Crowe (2011). "Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle." *Anim Reprod Sci* **124**(3-4): 163-169.
- Franco, H. L., J. W. Jeong, S. Y. Tsai, J. P. Lydon and F. J. DeMayo (2008). "In vivo analysis of progesterone receptor action in the uterus during embryo implantation." *Seminars in Cell & Developmental Biology* **19**(2): 178-186.
- Georges, A., A. Auguste, L. Bessiere, A. Vanet, A. L. Todeschini and R. A. Veitia (2013). "FOXL2: a central transcription factor of the ovary." *Journal of Molecular Endocrinology*.
- Hawkins, S. M. and M. M. Matzuk (2008). "The menstrual cycle: basic biology." *Annals of the New York Academy of Sciences* **1135**: 10-18.
- Krege, J. H., J. B. Hodgkin, J. F. Couse, E. Enmark, M. Warner, J. F. Mahler, M. Sar, K. S. Korach, J. A. Gustafsson and O. Smithies (1998). "Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(26): 15677-15682.
- Larionov, A., A. Krause and W. Miller (2005). "A standard curve based method for relative real time PCR data processing." *BMC Bioinformatics* **6**: 62.
- Lee, K. Y. and F. J. DeMayo (2004). "Animal models of implantation." *Reproduction* **128**(6): 679-695.
- Lonergan, P. (2011). "Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows." *Theriogenology* **76**(9): 1594-1601.
- Lubahn, D. B., J. S. Moyer, T. S. Golding, J. F. Couse, K. S. Korach and O. Smithies (1993). "Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after interstitial disruption of the mouse estrogen receptor gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(23): 11162-11166.
- Lydon, J. P., F. J. DeMayo, C. R. Funk, S. K. Mani, A. R. Hughes, C. A. Montgomery, Jr., G. Shyamala, O. M. Conneely and B. W. O'Malley (1995). "Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities." *Genes & development* **9**(18): 2266-2278.
- Mansouri-Attia, N., J. Aubert, P. Reinaud, C. Giraud-Delville, G. Taghouti, L. Galio, R. E. Everts, S. Degrelle, C. Richard, I. Hue, X. Yang, X. C. Tian, H. A. Lewin, J. P. Renard and O. Sandra (2009). "Gene expression profiles of bovine caruncular and intercaruncular endometrium at implantation." *Physiol Genomics* **39**(1): 14-27.
- Martal, J., M. C. Lacroix, C. Loudes, M. Saunier and S. Wintenberger-Torres (1979). "Trophoblastin, an antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep." *Journal of reproduction and fertility* **56**(1): 63-73.
- Mihm, M., S. Gangooly and S. Muttukrishna (2011). "The normal menstrual cycle in women." *Animal reproduction science* **124**(3-4): 229-236.
- Miller, B. G. and N. W. Moore (1976). "Effects of progesterone and oestradiol on endometrial metabolism and embryo survival in the ovariectomized ewe." *Theriogenology* **6**(6): 636.
- Moumne, L., A. Dipietromaria, F. Batista, A. Kocer, M. Fellous, E. Pailhoux and R. A. Veitia (2008). "Differential aggregation and functional impairment induced by polyalanine expansions in FOXL2, a transcription factor involved in cranio-facial and ovarian development." *Human Molecular Genetics* **17**(7): 1010-1019.
- Nugent, B. M., S. A. Tobet, H. E. Lara, A. B. Lucion, M. E. Wilson, S. E. Recabarren and A. H. Paredes (2012). "Hormonal programming across the lifespan." *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* **44**(8): 577-586.
- Okumu, L. A., N. Forde, A. G. Fahey, E. Fitzpatrick, J. F. Roche, M. A. Crowe and P. Lonergan (2010). "The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus." *Reproduction* **140**(1): 143-153.
- Ozturk, S. and R. Demir (2010). "Particular functions of estrogen and progesterone in establishment of uterine receptivity and embryo implantation." *Histology and histopathology* **25**(9): 1215-1228.

- Pannetier, M., S. Fabre, F. Batista, A. Kocer, L. Renault, G. Jolivet, B. Mandon-Pepin, C. Cotinot, R. Veitia and E. Pailhoux (2006). "FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development." *J Mol Endocrinol* **36**(3): 399-413.
- Pannetier, M. and E. Pailhoux (2011). "[Sex differentiation: state of the art and future prospects]." *Med Sci (Paris)* **27**(10): 859-865.
- Pant, H. C., C. R. Hopkinson and R. J. Fitzpatrick (1977). "Concentration of oestradiol, progesterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the jugular venous plasma of ewes during the oestrous cycle." *The Journal of endocrinology* **73**(2): 247-255.
- Pask, A. J. (2012). "A role for estrogen in somatic cell fate of the mammalian gonad." *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* **20**(1): 239-245.
- Pask, A. J., N. E. Calatayud, G. Shaw, W. M. Wood and M. B. Renfree (2010). "Oestrogen blocks the nuclear entry of SOX9 in the developing gonad of a marsupial mammal." *BMC Biology* **8**(1): 113.
- Pru, J. K. and N. C. Clark (2013). "PGRMC1 and PGRMC2 in uterine physiology and disease." *Frontiers in neuroscience* **7**: 168.
- Roberts, R. M., Y. Chen, T. Ezashi and A. M. Walker (2008). "Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals." *Seminars in Cell & Developmental Biology* **19**(2): 170-177.
- Sandra, O., N. Mansouri-Attia and R. G. Lea (2011). "Novel aspects of endometrial function: a biological sensor of embryo quality and driver of pregnancy success." *Reprod Fertil Dev* **24**(1): 68-79.
- Satterfield, M. C., G. Song, K. J. Kochan, P. K. Riggs, R. M. Simmons, C. G. Elsik, D. L. Adelson, F. W. Bazer, H. Zhou and T. E. Spencer (2009). "Discovery of candidate genes and pathways in the endometrium regulating ovine blastocyst growth and conceptus elongation." *Physiol Genomics* **39**(2): 85-99.
- Shimizu, T., S. Krebs, S. Bauersachs, H. Blum, E. Wolf and A. Miyamoto (2010). "Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine endometrium." *Physiological Genomics* **42A**(4): 290-300.
- Spencer, T. E. and F. W. Bazer (2002). "Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy." *Front Biosci* **7**: d1879-1898.
- Spencer, T. E., K. A. Dunlap and J. Filant (2012). "Comparative developmental biology of the uterus: insights into mechanisms and developmental disruption." *Molecular and Cellular Endocrinology* **354**(1-2): 34-53.
- Spencer, T. E., G. A. Johnson, F. W. Bazer and R. C. Burghardt (2004). "Implantation mechanisms: insights from the sheep." *Reproduction* **128**(6): 657-668.
- Spencer, T. E., O. Sandra and E. Wolf (2008). "Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches." *Reproduction* **135**(2): 165-179.
- Talbi, S., A. E. Hamilton, K. C. Vo, S. Tulac, M. T. Overgaard, C. Dosiou, N. Le Shay, C. N. Nezhat, R. Kempson, B. A. Lessey, N. R. Nayak and L. C. Giudice (2005). "Molecular Phenotyping of Human Endometrium Distinguishes Menstrual Cycle Phases and Underlying Biological Processes in Normo-Ovulatory Women." *Endocrinology* **147**(3): 1097-1121.
- Uhlenhaut, N. H., S. Jakob, K. Anlag, T. Eisenberger, R. Sekido, J. Kress, A.-C. Treier, C. Klugmann, C. Klasen, N. I. Holter, D. Riethmacher, G. Schütz, A. J. Cooney, R. Lovell-Badge and M. Treier (2009). "Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation." *Cell* **139**(6): 1130-1142.
- Uhlenhaut, N. H. and M. Treier (2011). "Forkhead transcription factors in ovarian function." *Reproduction* **142**(4): 489-495.
- Ulbrich, S. E., E. Wolf and S. Bauersachs (2012). "Hosting the preimplantation embryo: potentials and limitations of different approaches for analysing embryo-endometrium interactions in cattle." *Reproduction, fertility, and development* **25**(1): 62-70.

Verdin, H. and E. De Baere (2012). "FOXL2 impairment in human disease." Hormone research in paediatrics 77(1): 2-11.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. FOXL2 expression in cyclic and pregnant ovine endometrium

Caruncular (CAR) and intercaruncular (ICAR) endometrial areas were collected from cyclic (n=4 at day 4, n=4 at day 8, n=4 at day 12) Pré-alpes du sud ewes. Two other animal cohorts were added to this study, then CAR and ICAR endometrial areas were collected from cyclic and pregnant (Cyc, n=4; preg, n=4 at day 15) Pré-alpes du sud ewes. (A) Quantification of *FOXL2* mRNA by RT-qPCR. Expression of *FOXL2* was normalized to *RPL19*. (B) Quantification of *FOXL2* protein by western blotting normalized to *ACTB* protein level. Quantitative data are presented as mean +/- SEM and significant differences were noted using * : $P < 0.05$.

Figure 2. Regulation of FOXL2 gene expression under the influence of altered P4 circulating level

Caruncular (CAR) and intercaruncular (ICAR) endometrial areas were collected from pregnant Pré-alpes du sud ewes treated with DMSO as a control solution (n=7) or trilostane (15 mg/ewe in 1 ml DMSO) for 11 days. (A) Quantification of *FOXL2* mRNA by RT-qPCR. Expression of *FOXL2* was normalized to *RPL19*. (B) Quantification of *FOXL2* protein by western blotting. *FOXL2* expression was normalized to *ACTB* protein level. Quantitative data are presented as mean +/- SEM significant differences were noted using * : $P < 0.05$.

Figure 3. FOXL2 endometrial expression under the influence of ovarian steroid hormones balance in ovariectomized ewes

Caruncular (CAR) and intercaruncular (ICAR) endometrial areas were collected from ovariectomized Pré-alpes du sud ewes supplemented with a control solution (OVX, n=4), [P4] solution (OVX + P4, n=4), [E2] solution (OVX + E2, n=4) or [P4+E2] solution (OVX + E2

+ P4, n=4) for 12 days and also from cyclic ewes at 12 days (n=4). (A) Quantification of *FOXL2* mRNA by RT-qPCR. Expression of *FOXL2* was normalized to *RPL19*. (B) Quantification of *FOXL2* protein by western blotting. *FOXL2* expression was normalized to *ACTB* protein level. Quantitative data are presented as mean +/- SEM and significant differences were noted using * : $P < 0.05$.

Figure 4. *FOXL2* endometrial expression under the influence of ovarian steroid hormones balance in ovariectomized cows and bovine explants

(A) Strips of both endometrial areas were collected from ovariectomized cows supplemented with a control solution (OVX, n=3), [P4] solution (OVX + P4, n=3), [E2] solution (OVX + E2, n=3) or [P4+E2] solution (OVX + E2 + P4, n=3). (B) Intercaruncular strips were collected from cyclic cows at oestrus stage. These explants were cultivated for 48h and supplemented with a control solution (OVX, n=2), P4 solution (OVX + P4, n=2) or E2 solution (OVX + E2, n=2). (A) and (B) Quantification of *FOXL2* mRNA by RT-qPCR. Expression of *FOXL2* was normalized to *RPL19*. Quantitative data are presented as mean +/- SEM and, bars with different superscripts significantly differ ($P < 0.05$) and significant differences were noted using * : $P < 0.05$.

PGR ?

Figure 5. Direct regulation of *FOXL2* promoter activity by P4 in COS7 cells

COS7 cells were cultivated for few passages then transfected using Xtreme gene transfection reagent with *FOXL2*-promoter sequence (1kb) associated with luciferase gene and PGR A and B expressing vectors for 48 hours with or without P4 treatment. Activity of *FOXL2* promoter was normalized to TK-Renilla vector activity. Quantitative data are presented as mean +/- SEM and significant differences were noted using **** : $P < 0.001$.

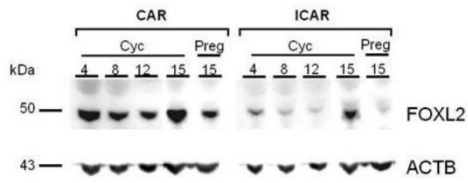
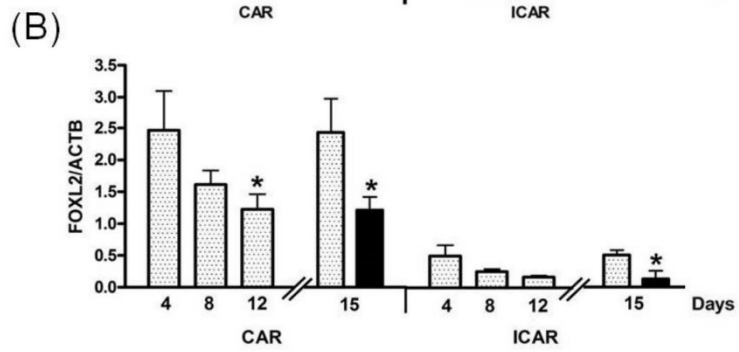
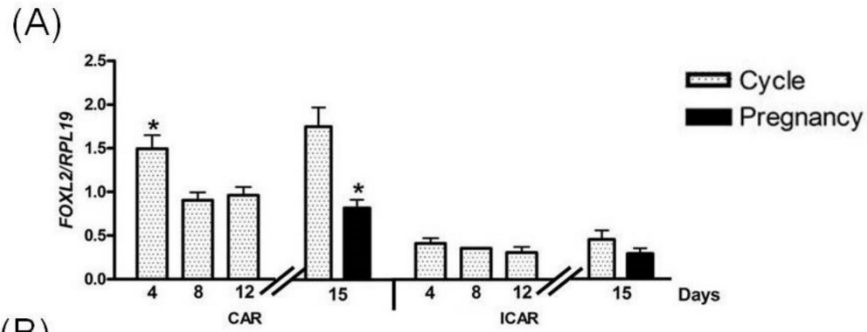


Fig.1

Fig1

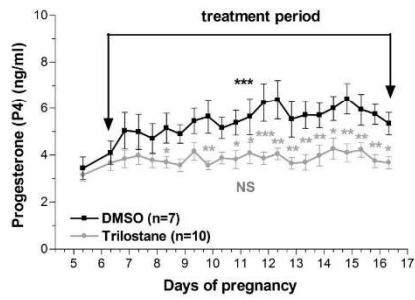
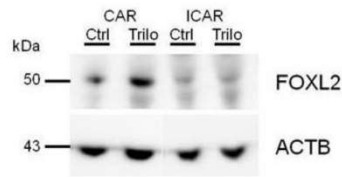
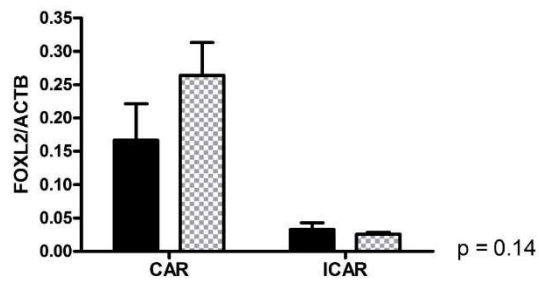
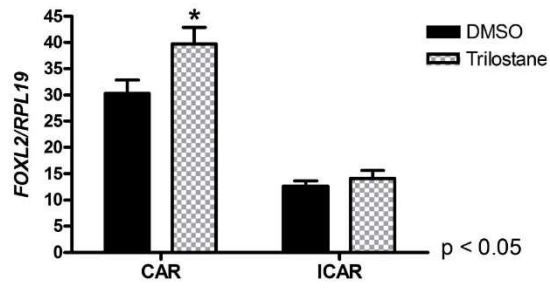


Fig2

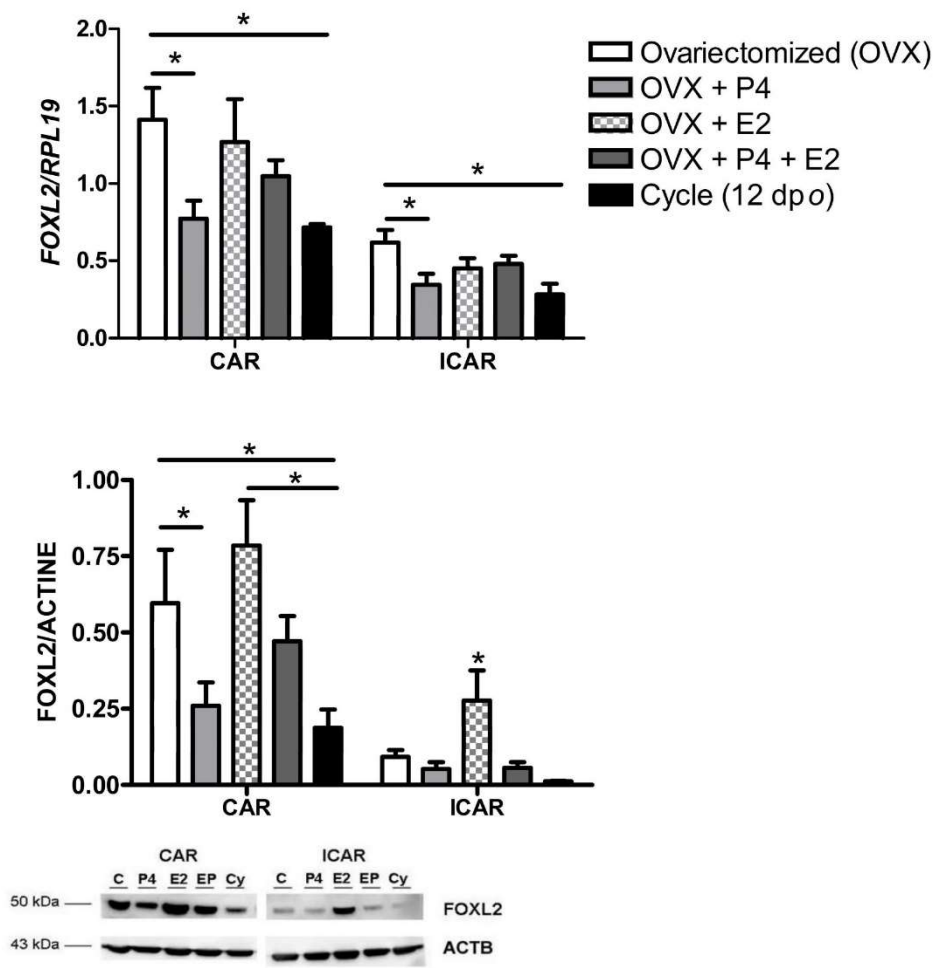
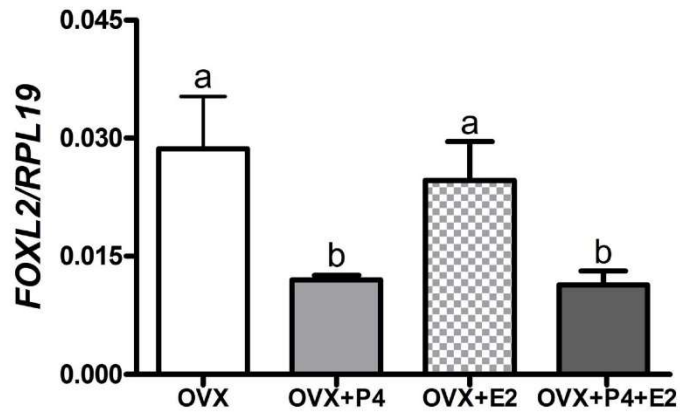


Fig3

(A)



(B)

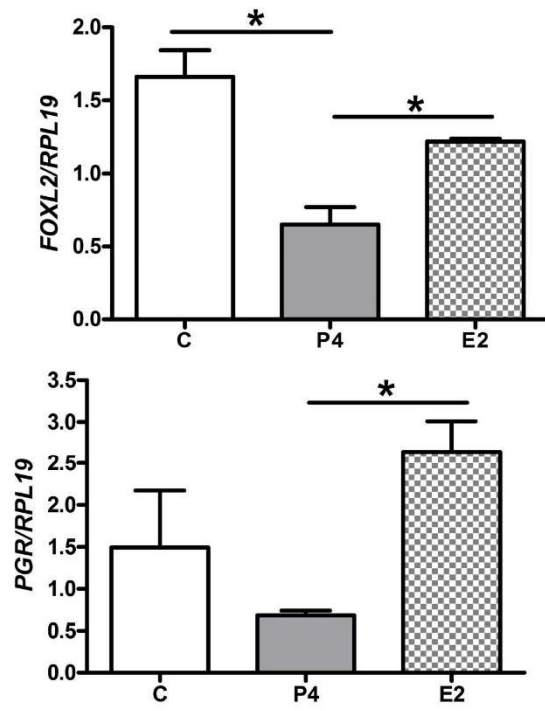


Fig4

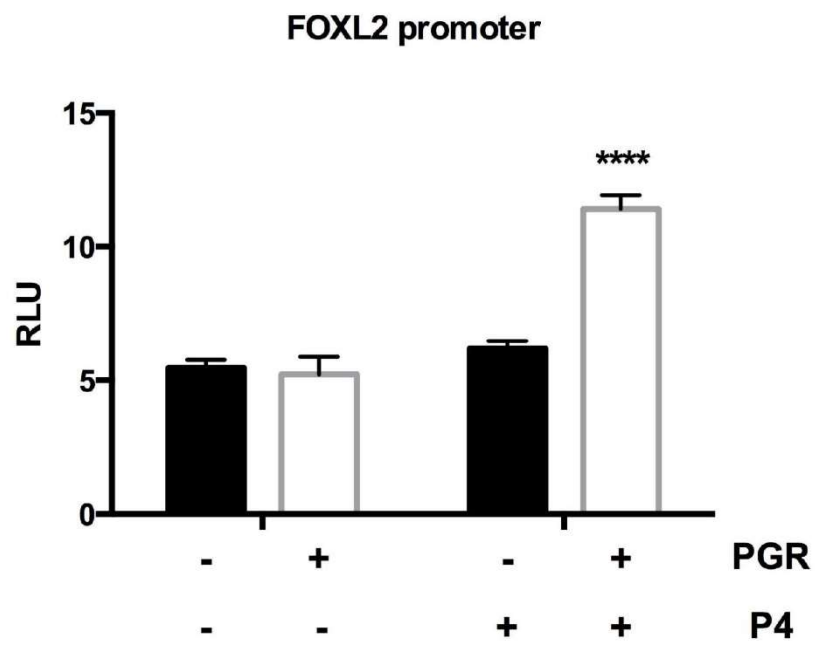


Fig5

5. Collaborations

a- SSR 2017

Extracellular Vesicles from Early Pregnant Uterine Fluids Promote Expression of Implantation-Related Markers in Ovine Endometrium.

Laurent Galio, Kais Hussain Al-Gubory, Juliette Cognié, Pierrette Reinaud, Corinne Giraud-Delville, Soahary Jean-René, Mariam Raliou, Audrey Lesage-Padilla, Gilles Charpigny, Christine Péchoux, Pierre Adenot, Corinne Cotinot, Olivier Sandra.

UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, Jouy en Josas, France; PRC, CNRS, IFCE, INRA, Université de Tours, Nouzilly, France; GABI, INRA, Agroparistech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France; MIMA2 Platform, INRA, Jouy en Josas, France.

Extracellular vesicles (EVs) are crucial for intercellular communications and they may play important role in the delivery of molecular messages during the pre-implantation period of pregnancy. EVs have been isolated from uterine luminal fluid (ULF) in human and sheep. Recent data have provided evidence that EVs contained in ovine ULF can penetrate endometrial epithelial cells after a 6-days infusion in vivo. Nevertheless, embryo implantation involves rapid and dynamic changes in molecular interactions with the endometrium. Our present work aims to determine whether EVs collected from ULF interact with endometrial epithelial cells and modify cell physiology after a short time of in vitro and in vivo incubation conditions. Primary cultures of endometrial epithelial cells were derived from ovine uteri on day 12 post-oestrus. EVs were purified from ovine ULFs on Day 14 of pregnancy (2 days before conceptus implantation). The presence of EVs in ULF was confirmed by transmission electron microscopic observation. ULF EVs were labeled with lipophilic PKH26 fluorescent dye and then incubated with primary cultures of epithelial cells during 30 min to 24h. Confocal microscopy analyses revealed an uptake of EVs as early as 30 minutes after incubation, followed by a progressive increase of intracellular fluorescence up to 6 hours. For the in vivo study, ovine ULF EVs isolated on Day 14 of pregnancy were labeled with PKH26 fluorescent dye and infused into the uterine lumen of cyclic ewes on Day 12 post-oestrus. After 24h, numerous epithelial cells from the luminal layer and superficial glands exhibited an intensive fluorescence signal, whereas deep endometrial glands displayed few fluorescent cells. No signal was detectable in the stroma. The impact of EVs on endometrial function was investigated by quantifying transcript expression of a selection of endometrial genes. First data pointed out that expression of two genes, including the Myxovirus-Resistance Protein (MX1) was up-regulated following EVs uptake by the endometrial epithelium. This work provides first evidence that ovine EVs from pregnant ULF can (i) enter in endometrial epithelial cells within 30 min in vitro or 24h in vivo (ii) modulate expression of endometrial gene expression known to be critical for embryo implantation. These results suggest a critical role for EVs in the preparation of endometrium when implantation initiates.

b- Fertility 2018

Aged endometrium displays perturbations of inflammation-related molecular pathways compared with fertile endometrium in cattle

Olivier Sandra, Maud Pez, Audrey Lesage-Padilla, Pierrette Reinaud, Luc Jouneau, Sophie Mockly, Anais Vitorino Carvalho, Christophe Richard, Valérie Gelin, Corinne Giraud-Delville, Catherine Archilla, Marco Moroldo, François Vialard, Véronique Duranthon, Pierre Germon, Hélène Jammes, Gilles Charpigny

UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350, Jouy en Josas, France

ISP, INRA, Université François Rabelais de Tours, UMR 1282, Nouzilly, France.

Unité Commune d'Expérimentation Animale de Bressonvilliers (UCEA), INRA, 91030 Leudeville, France.

GABI, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, F-78350, Jouy-en-Josas, France.

GIG - EA 7404 Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Université Paris-Saclay, Unité de Formation et de Recherche des Sciences de la Santé Simone Veil, Montigny-le-Bretonneux, France.

Ageing is a physiological process defined by cellular perturbations of tissue and organ functions. In women, age at first pregnancy has been reported to gradually increase. Decline in reproductive performances has been associated with ageing and has been essentially investigated in the ovarian function, in term of quality and quantity of oocytes. Nevertheless, pregnancy issue and post-natal health also rely on the active contribution of the endometrium as early as implantation takes place. The objective of our study was to evaluate the consequences of maternal ageing on the endometrium using a model of bovine females generated from the same bovine somatic cell line. Old heifers (OH group; n=8; mean age: 13.1±0.2 y) and younger females of proven fertility (primiparous cows; PC group; n=9; mean age: 4.6±0.3 y) were oestrus synchronized and endometrial biopsies were taken at Day 15 post-estrus. Transcriptional profiles were determined (n=4 females/group) using a non commercial bovine oligoarray representing 23,926 unique genes. No significant differentially expressed gene was identified in the [OH group vs. PC group] comparison (adjusted P-value<0.05). Nevertheless Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) unveils significant perturbations of various molecular pathways in the endometrium of OH group including “myogenesis”, “IFN alpha response”, and “TNF alpha signaling” pathways. To evaluate how OH and PC endometrium responds to embryonic factors, primary cultures of fibroblasts (F) or glandular epithelial (GE) cells were derived from endometrial biopsies (n=3 animals/group) and incubated with recombinant interferon-tau (100 ng/ml). In GE cells treated with interferon-tau for 1h, fold induction of *MX1* and *RSAD2* transcripts was significantly lower (OH group vs. PC group: 0.32 vs. 1.71 and 13.65 vs. 47.02 respectively, P<0.01). Our data illustrate age-dependent modifications of endometrial physiology that may modify interactions with the embryo at implantation. Detrimental consequences on progression of pregnancy and progeny health will deserve further studies.

Titre : Rôles de *FOXL2* dans la physiologie endométriale chez les bovins

Mots clés : Bovin, utérus, facteur de transcription, métabolisme, gestation, transcriptomique

Résumé : L'implantation est une étape cruciale de la gestation et du développement post-natal chez les mammifères. L'implantation est définie comme l'établissement d'interactions cellulaires et permanentes entre un endomètre réceptif et un embryon compétent et synchronisé. L'endomètre est un capteur (*sensor*) biologique de qualité embryonnaire qui conduit la trajectoire de développement du conceptus jusqu'à terme. Les données préalables de notre équipe et d'autres ont suggéré que *FOXL2* - un facteur de transcription clé pour l'établissement et le maintien de la fonction ovarienne - pourrait avoir des rôles biologiques majeurs dans le développement et les fonctions de l'endomètre chez les mammifères. L'objectif de mon travail était de comprendre dans quelle mesure *FOXL2* contribue à la régulation de la fonction endométriale chez les bovins laitiers. Nous avons d'abord évalué les conséquences des variations du métabolisme maternel sur l'expression endométriale de *FOXL2* et une sélection de gènes candidats. Notre étude a mis en évidence que, chez les femelles Holstein primipares taries immédiatement après le vêlage, l'expression de *FOXL2* est augmentée alors que l'expression des enzymes antioxydantes est diminuée dans l'endomètre lors de l'implantation. Grâce à un modèle *in vitro* de cultures primaires de cellules endométriales bovines (fibroblastes et cellules épithéliales glandulaires) surexprimant transitoirement *FOXL2*, nous avons pu montrer que l'expression des gènes codant pour les enzymes antioxydantes n'est pas dépendante de *FOXL2*. Sur la base de notre modèle expérimental *in vitro*, les profils d'expression des gènes ont ensuite été déterminés à l'aide d'un oligoarray bovin non commercial. L'analyse des données a révélé une variation de l'identité des gènes cible de *FOXL2* en fonction du type cellulaire considéré. Comme dans l'ovaire, *FOXL2* régule des gènes liés à "la réponse immunitaire", "l'apoptose" et "la détermination du sexe". Nos résultats ont également mis en évidence la régulation par *FOXL2* de fonctions spécifiques de l'endomètre, telles que «la réponse à l'interféron de type I» et «la modification de matrice extracellulaire». En somme, nos données mettent en lumière le rôle de *FOXL2* dans la régulation de la physiologie endométriale bovine. Ses fonctions biologiques mériteraient d'être analysées et comparées chez d'autres espèces de mammifères.

Title : *FOXL2* functions in endometrial physiology in cattle

Keywords : Cattle, uterus, transcription factor, metabolism, pregnancy, transcriptomic

Abstract : Implantation is a critical milestone ensuring a successful pregnancy and normal post-natal development in mammals. Implantation is defined as the establishment of cellular and permanent interactions between a receptive endometrium and a competent and synchronised embryo. Endometrium has been proposed to be a biological sensor of embryo quality that drives the developmental trajectory of the conceptus until term. Previous data from our team and others have suggested major biological roles for *FOXL2* - a key transcription factor for the establishment and maintenance of ovarian function- in the development and functions of the mammalian endometrium. The aim of my work was to provide new insights on the contribution of *FOXL2* to the regulation of the endometrial function in dairy cattle. We first evaluated the consequences of variations in maternal metabolism on the endometrial expression of *FOXL2* and a selection of candidate genes. Our data demonstrated that, in Holstein primiparous females dried immediately after parturition, *FOXL2* expression was increased whereas antioxidant enzymes expression was decreased in the endometrium at implantation. Using an *in vitro* model of primary cultures of bovine endometrial cells (fibroblasts and glandular epithelial cells) transiently overexpressing *FOXL2*, expression of genes encoding antioxidant enzymes did not appear to be *FOXL2* dependant. Based on our *in vitro* experimental model, gene expression profiles were then determined using a bovine custom oligoarray. Data analyses unveil differences in *FOXL2*-regulated genes according to endometrial cell origin. As in the ovary, *FOXL2* regulated sets of genes related to "immune response", "apoptosis" and "sex determination". Our results also highlighted regulation of endometrium-specific genes by *FOXL2* including "response to type I interferon" and "extracellular matrix modification". Altogether our data support the involvement of *FOXL2* in the regulation of bovine endometrial physiology that deserves to be analyzed in other mammalian species.