



Etude des gènes *Dlx5/6* et *Foxl2* dans le développement et la fonction de l'utérus chez la souris

Brice Bellessort

► To cite this version:

Brice Bellessort. Etude des gènes *Dlx5/6* et *Foxl2* dans le développement et la fonction de l'utérus chez la souris. Biologie de la reproduction. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. <NNT : 2015PA066043>. <tel-01313555>

HAL Id: tel-01313555

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01313555>

Submitted on 10 May 2016

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

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

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Ecole doctorale Complexité du Vivant – ED 515

Spécialité
Biologie du développement et reproduction

Présentée par
M. Brice Bellessort

Laboratoire d'accueil
UMR7221 CNRS/MNHN Evolution des régulations endocriniennes

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Etude des gènes *Dlx5/6* et *Foxl2* dans le développement et la fonction de
l'utérus chez la souris

soutenue le 2 Avril 2015

devant le jury composé de :

M. TOURAINE Philippe	Professeur – Université Paris VI	Président du jury
Mme. DIEUDONNE Marie-Noëlle	Professeure– Université Paris XI	Rapporteuse
M. PAILHOUX Eric	Directeur de Recherche – INRA	Rapporteur
M. VAIMAN Daniel	Directeur de Recherche – Université Paris V	Examineur
M. VEITIA Reiner	Professeur – Université Paris VII	Examineur
M. SANDRA Olivier	Chargé de Recherche – INRA	Examineur
M. LEVI Giovanni	Directeur de Recherche – CNRS	Directeur de thèse

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Ecole doctorale Complexité du Vivant – ED 515

Spécialité
Biologie du développement et reproduction

Présentée par
M. Brice Bellessort

Laboratoire d'accueil
UMR7221 CNRS/MNHN Evolution des régulations endocriniennes

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Etude des gènes *Dlx5/6* et *Foxl2* dans le développement et la fonction de
l'utérus chez la souris

soutenue le 2 Avril 2015

devant le jury composé de :

M. TOURAINE Philippe	Professeur – Université Paris VI	Président du jury
Mme. DIEUDONNE Marie-Noëlle	Professeure– Université Paris XI	Rapporteuse
M. PAILHOUX Eric	Directeur de Recherche – INRA	Rapporteur
M. VAIMAN Daniel	Directeur de Recherche – Université Paris V	Examineur
M. VEITIA Reiner	Professeur – Université Paris VII	Examineur
M. SANDRA Olivier	Chargé de Recherche – INRA	Examineur
M. LEVI Giovanni	Directeur de Recherche – CNRS	Directeur de thèse

A ma mère et à la mère de tout les Hommes...

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier toutes celles et ceux qui m'ont soutenu ces 4 années durant. Je souhaite aussi remercier toutes les personnes qui liront ces pages.

Je remercie très sincèrement tout les membres du jury de thèse qui ont accepté d'évaluer mon travail. Dr. Eric Pailhoux et Pr. Marie Noëlle Dieudonné pour avoir accepté de rapporter mon manuscrit. Je remercie les Pr. Philippe Touraine, Dr. Olivier Sandra, Pr. Reiner Veitia et Dr. Daniel Vaiman pour avoir examiné mon travail. Enfin, je tiens particulièrement à remercier mon directeur de thèse Giovanni Levi pour m'avoir accueillie très tôt dans son équipe et avoir fait de son mieux pour m'encourager et pour m'encadrer dans ce projet.

Je remercie Barbara Demeneix, pour m'avoir accueillie au sein de son unité CNRS UMR7221 Evolution des régulations endocriniennes au Muséum d'Histoire Naturelle.

Plus particulièrement je remercie chacun de mes collègues du 3^{ème} étage sans qui rien de toute cette histoire n'aurait été réalisable.

Nastia pour tout le travail irréprochable que tu as pu faire en pâtisserie comme en manip.

Gladys pour tes magnifiques qPCR, pour ta jovialité, ton caractère vrai et ta cuisine « bizarre » mais délicieuse (je taquine).

Ocilia et Aurélie pour tout votre travail colossale à l'animalerie. Yorick, pour son soutien sucrologique et pour tous ces desserts inattendus.

Nicolas, pour chaque réponse que tu as donné à mes questions si débiles soit-elles et pour ton soutien toujours sans jugement.

Eglantine, pour ta bonne humeur, ton enthousiasme inébranlable et ta sincérité. Pour toutes ces conversations aux pauses clopes qui paradoxalement étaient des véritables bouffées d'oxygènes pour moi, pour ta vision de la science.

Je tiens aussi à remercier tous les collaborateurs de fin de semaine pour les décompressions collectives et ses magnifiques moments passés ensemble, Céline, Laëticia, Gweneg, Marion, Jean-David, Laurent, Lindsey, James and co..

Et le plus important, je remercie toute ma famille qui m'a encouragé sans faillir durant ces longues années de labeur. Ma mère, qui a su me guider et m'épauler toujours vers le meilleur pour moi-même. Ma sœur, merci Jojo pour tout. Mon frère avec sa force tranquille, merci Thibault. Et mon père pour avoir été là, plus présent que jamais. Je remercie aussi tous mes amis pour ces belles années passées avec eux riches en émotions. Merci à Mario, Sofian, Tristan, Génifaire, Zeb et Sarah.

En espérant que mes travaux ont pu faire avancer la science, je remercie aussi chacune des souris qui a donné sa vie pour cette avancé si infime soit-elle.

Résumé - Abstract

1. RESUME

Le gène *Foxl2* code pour un facteur de transcription membre de la famille forkhead/HNF3. Chez l'Homme, des mutations dans le gène *FOXL2* sont associées au syndrome de blépharophimosis ptôsis épicanthus inversus (BPES), qui est caractérisé par des malformations des paupières et peut être associé à une insuffisance ovarienne prématurée dans certains cas chez les femmes atteintes.

Chez la souris, la mutation de ce gène provoque un défaut de formation des paupières et un défaut de maturation des follicules ovariens, reproduisant des aspect du BPES. Dans les ovaires, il existe une régulation réciproque entre *Foxl2* et *Dlx5* et *Dlx6*, dans les cellules de la granulosa où ils permettent la maturation des follicules ovariens.

Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressé à l'implication de *Foxl2*, *Dlx5* et *Dlx6* dans le développement et la fonction de l'utérus. De plus, j'ai contribué à la caractérisation du défaut de formation des paupières provoqué par l'inactivation de *Foxl2*.

Dans l'utérus, l'expression de *Foxl2* est présente dès la naissance dans le mésenchyme qui, pendant la maturation post-natale, donne origine au stroma et au myomètre. *Foxl2* est exprimé dans le stroma et dans la partie profonde du myomètre en formation. Pour étudier le rôle de *Foxl2* dans la maturation post-natale et la fonction de l'utérus, nous l'avons invalidé de manière conditionnelle grâce à l'action de la cre recombinase contrôlée par le promoteur du récepteur de la progestérone (*Pgr*^{cre/+}). Les souris femelles *Pgr*^{cre/+}; *Foxl2*^{flox/flox} sont infertiles. De plus, l'utérus de ces souris présente une diminution du stroma, une hypertrophie et une désorganisation du myomètre interne. On note aussi chez ces mutants une absence de formation de la couche de cellules musculaires lisses entourant les vaisseaux sanguins dans le stroma. L'étude par qPCR montre que l'inactivation de *Foxl2* dérégule l'expression de certains gènes *Wnt*, impliqués dans la maturation utérine. En conclusion, nos données suggèrent que *Foxl2* a un rôle crucial dans la maturation postnatale du mésenchyme de l'utérus et dans la différenciation et l'organisation du myomètre.

En parallèle de mon étude sur *Foxl2*, j'ai étudié l'expression de *Dlx5* dans l'utérus, avec l'hypothèse qu'une régulation réciproque entre ces gènes pouvait aussi avoir un rôle dans cet organe. Les gènes *Dlx5* et *Dlx6* codent pour des facteurs de transcription à homéodomaine liés au gène *Distal-less* (*Dll*) chez la drosophile.

Dlx5 est présent dans l'épithélium des canaux de Müller à partir de E15.5 puis dans l'épithélium utérin durant toute la maturation post-natale et chez l'adulte. De la même manière que pour étudier *Foxl2* dans la maturation post-natale de l'utérus, nous avons invalidé de manière conditionnelle *Dlx5* et *Dlx6* par l'action de la *Pgr*^{cre/+}. L'étude montre que les souris *Pgr*^{cre/+}; *Dlx5/6*^{flox/flox} ont un nombre très réduit de glandes utérines et que la lumière utérine présente de nombreuses invaginations anormalement larges comparées aux souris contrôles. L'épithélium de ces mutants est réduit. En PCR quantitative, nous avons montré une augmentation de l'expression *Wnt7a* et une diminution de l'expression de *Foxa2* qui jouent tous deux un rôle dans la formation des glandes. De plus, nous montrons que l'expression de *DLX5* est perturbée dans une pathologie humaine, l'endométriose, supposant que sa dérégulation pourrait jouer un rôle dans cette pathologie. *Dlx5* et *Dlx6* joueraient donc un rôle primordial dans la génération des glandes utérines, nécessaires chez l'adulte à l'implantation de l'embryon.

2. ABSTRACT

The *Foxl2* gene encodes a transcription factor forkhead family member / HNF3. In humans mutations in FOXL2 are associated with blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome (BPES), which is characterized by malformations of the eyelids and associated with premature ovarian failure in some cases in women. In mouse, *Foxl2* is implicated in ovarian follicles maturation and reproducing aspect of BPES. In the ovaries, there is a mutual regulation between *Foxl2* and *Dlx5* and *Dlx6* in the granulosa cells that permit the maturation of ovarian follicles.

In my thesis work, I am interested in the involvement of *Foxl2*, *Dlx5* and *Dlx6* in the development and function of the uterus. In addition, I contributed to the characterization of the formation of default eyelid caused by the mutation *Foxl2*.

In the uterus, the expression of *Foxl2* is present from birth during postnatal maturation in the mesenchyme that gives origin to the stroma and myometrium. *Foxl2* is expressed in the stroma and in the deep part of the training myometrium. To study the role of *Foxl2* in the postnatal maturation and function of the uterus, we conditionally deleted *Foxl2* with cre recombinase controlled by the promoter of the Progesterone Receptor 2 (*Pgr*^{cre/+}). Female mice *Pgr*^{cre/+}; *Foxl2*^{flox/flox} are infertile. In addition, these mice uterus has a decrease stromal layer and a hypertrophy and disruption of the internal myometrium layer. These mutants lack smooth muscle cell layer surrounding the blood vessels in the stroma. The study by qPCR shows that inactivation of *Foxl2* deregulates the expression of certain *Wnt* genes involved in the maturation of the uterus. In conclusion, our data suggest that *Foxl2* has a crucial role in the postnatal maturation of the uterine mesenchyme and in the differentiation and organization of the myometrium.

Alongside my study on *Foxl2*, I also studied the expression of *Dlx5* in the uterus, thinking that a reciprocal regulation of these genes could also have a role in this organ. The *Dlx5* and *Dlx6* genes encode transcription factors related homeodomain gene *Distal-less (Dll)* in *Drosophila*. *Dlx5* is present in the epithelium of Müllerian ducts from E15.5 and in the uterine epithelium during the postnatal maturation and adulthood. In the same way as for studying *Foxl2* in the postnatal maturation of the uterus, we conditionally deleted *Dlx5* and *Dlx6* by the action of *Pgr*^{cre/+}. The study shows that mice *Pgr*^{cre/+}; *Dlx5/6*^{flox/flox} present a strong reduction of uterine glands and the uterine lumen shows invaginations abnormally large compared to control mice. The epithelium of these mutants is abnormally reduced. Quantitative PCR experiments show increased expression of *Wnt7a* and a decrease in the expression of *Foxa2*, any two that play a role in the formation of the glands. Moreover, we show that the expression of DLX5 is disturbed in a human disease, endometriosis, assuming its deregulation may play a role in this disease. *Dlx5* and *Dlx6* therefore play a key role in the generation of uterine glands, necessary in adults during embryo implantation.

Table des matières

REMERCIEMENTS	4
RESUME - ABSTRACT	6
1. RESUME	7
2. ABSTRACT	8
TABLE DES MATIERES	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS	12
LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLE	14
INTRODUCTION	17
1. L'UTERUS : DEVELOPPEMENT ET FONCTION	18
1.1. LES VOIES GENITALES FEMINIQUES	18
1.1.1. Formation et différenciation des voies génitales	18
1.1.2. Maturation post-natale de l'utérus chez la souris	20
1.1.2.1. Maturation histologique	20
1.1.2.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation post-natale utérine	24
1.2. FONCTION DE L'UTERUS	31
1.2.1. Régulation hormonales	31
1.2.1.1. L'axe gonadotrope	31
1.2.1.2. Le Cycle œstral	33
1.2.1.3. Modification structural de l'utérus durant le cycle œstral	34
1.2.2. Rôle de l'utérus : l'implantation embryonnaire	36
1.2.2.1. Transport des spermatozoïdes	36
1.2.2.2. L'implantation embryonnaire	36
2. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DLX5, DLX6 ET FOXL2 : IMPLICATIONS DANS LA REPRODUCTION	41
2.1. LES GENES <i>DLX5</i> ET <i>DLX6</i>	41
2.1.1. Les gènes <i>Dlx</i>	41
2.1.2. Rôle de <i>Dlx5/6</i> chez la souris	45
2.1.2.1. Inactivation des gènes <i>Dlx5</i> et <i>Dlx6</i> chez la souris	45
2.1.2.2. Rôle des gènes <i>Dlx5</i> et <i>Dlx6</i> dans la reproduction	48
2.2. LE GENE <i>FOXL2</i>	52
2.2.1. Profil d'expression de <i>Foxl2</i>	52
2.2.2. Rôle de <i>Foxl2</i>	56
2.2.2.1. Mutations de <i>FOXL2</i> chez l'Homme	56
2.2.2.2. Les souris invalidées pour <i>Foxl2</i>	57
2.2.3. Les cibles transcriptionnelles de <i>Foxl2</i>	61
2.2.3.1. Cibles ovariennes de <i>Foxl2</i>	61
2.2.3.2. Cibles hypophysaires	61
2.3. <i>FOXL2</i> ET <i>DLX5/6</i> DANS L'UTERUS	62
2.3.1. <i>Foxl2</i> dans l'utérus	62
2.3.2. <i>Dlx5</i> dans l'utérus	64
RESULTATS	65
1. INTRODUCTION AUX TRAVAUX DE THESE	66
2. RESUME DE L'ARTICLE 1	67
2.1. <i>FOXL2</i> EST EXPRIME DANS L'UTERUS DES LA NAISSANCE ET PERSISTE JUSQU'A CHEZ L'ADULTE	67
2.2. LES CELLULES <i>FOXL2</i> POSITIVES DONNENT NAISSANCE A LA PARTIE PROFONDE DU MYOMETRE INTERNE ET A LA PAROI DES VAISSEAUX SANGUINS.	67
2.3. L'INACTIVATION CONDITIONNELLE DE <i>FOXL2</i> DANS L'UTERUS PROVOQUE UNE INFERTILITE	67

2.4. INACTIVATION CONDITIONNELLE DE <i>Foxl2</i> DANS L'UTERUS PROVOQUE UNE ARCHITECTURE ANORMALE DU TISSU ET UN DEFAUT DE FORMATION DE LA COUCHE DE CELLULES MUSCULAIRES ENTOURANT LES ARTERES	67
2.5. EFFET DE L'INACTIVATION DE <i>Foxl2</i> SUR DES GENES CLES IMPLIQUES DANS LA MATURATION POST-NATALE	68
3. ARTICLE 1	69
4. RESUME DE L'ARTICLE 2	82
4.1. <i>Dlx5</i> ET <i>Dlx6</i> S'EXPRIMENT DANS L'EPITHELIUM DURANT LE DEVELOPPEMENT ET LA MATURATION POST-NATALE L'UTERUS.....	82
4.2. L'INACTIVATION CONDITIONNELLE DE <i>Dlx5</i> ET <i>Dlx6</i> DANS L'UTERUS PROVOQUE UN DEFAUT DE FORMATION DES GLANDES UTERINES, ASSOCIE A LA PRESENCE D'INVAGINATIONS ANORMALES ET A UN CHANGEMENT DE MORPHOLOGIE EPITHELIALE.	82
4.3. INACTIVATION CONDITIONNELLE DE <i>Dlx5</i> ET <i>Dlx6</i> DANS L'UTERUS AGIT SUR L'EXPRESSION DE GENES CLES GOUVERNANT LA MATURATION UTERINE	82
4.4. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE <i>Dlx5</i> DANS L'ENDOMETRIOSE.....	83
5. ARTICLE 2	84
6. RESUME DE L'ARTICLE 3	111
6.1. <i>Foxl2</i> EST EXPRIME DANS LES CELLULES DE LA CRETE NEURALE CEPHALIQUE ET LES CELLULES DU MESODERME CRANIEN.	111
6.2. <i>Foxl2</i> EST REQUIS POUR LA FERMETURE DES PAUPIERES	111
6.3. L'INACTIVATION DE <i>Foxl2</i> INTERFERE AVEC LE DEVELOPPEMENT DES MUSCLES EXTRA-OCULAIRES	112
6.4. DEFAUTS SQUELETTIQUES DES SOURIS INACTIVEES POUR <i>Foxl2</i>	112
7. ARTICLE 3	113
<u>DISCUSSION</u>	<u>126</u>
1. <i>Foxl2</i> EST REQUIS POUR L'ORGANISATION DU STROMA ET DU MYOMETRE	127
2. <i>Dlx5</i> ET <i>Dlx6</i> PERMETTENT LA FORMATION DES GLANDES UTERINES UTERINE.....	131
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>135</u>
<u>ANNEXES.....</u>	<u>147</u>

Table des illustrations

➤	FIGURE 1: FORMATION DES CANAUX DE MÜLLER ET DIFFERENCIATION SEXUELLE CHEZ LA SOURIS	19
➤	FIGURE 2 MATURATION POST-NATALE DE L'UTERUS MURIN	21
➤	FIGURE 3: DEVELOPPEMENT DU MYOMETRE CHEZ LA SOURIS	22
➤	FIGURE 4: DEVELOPPEMENT DES GLANDES UTERINES CHEZ LA SOURIS	23
➤	FIGURE 5: LES GENES HOX ET WNT DURANT LA MORPHOGENESE PRENATALE ET LA MATURATION POST-NATALE UTERINE	25
➤	FIGURE 6 : VOIES DE SIGNALISATION DES WNT.....	27
➤	FIGURE 7: AXE GONADOTROPE ET REGULATION HORMONALE CHEZ LA FEMELLE.....	32
➤	FIGURE 8 : STRUCTURE DE L'OVAIRE ADULTE CHEZ LA SOURIS.....	33
➤	FIGURE 9: ASPECT HISTOLOGIQUE DE L'UTERUS MURIN ET VARIATIONS HORMONALES DURANT LE CYCLE OESTRAL.	35
➤	FIGURE 10: IMPLANTATION EMBRYONNAIRE DANS L'UTERUS CHEZ LA SOURIS.....	38
➤	FIGURE 11: DYNAMIQUE DE L'IMPLANTATION CHEZ LA SOURIS	40
➤	FIGURE 12 : PROFIL D'EXPRESSION DU GENE DISTAL-LESS (DLL) CHEZ LA DROSPHILE	42
➤	FIGURE 13 : MODELE DE L'EVOLUTION DES GENES DLX.....	43
➤	FIGURE 14 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ORGANISATION GENOMIQUE DES GENES DLX HUMAINS	44
➤	FIGURE 15 : PROFIL D'EXPRESSION DES GENES DLX5 CHEZ L'EMBRYON DE SOURIS.....	45
➤	FIGURE 16 : CONSTRUCTION UTILISEE POUR LA GENERATION DU DOUBLE MUTANT DLX5;DLX6	46
➤	FIGURE 17 : PHENOTYPE « CRANIO-FACIAL » DES EMBRYONS DE SOURIS DLX5/6 ^{-/-}	47
➤	FIGURE 18 : PHENOTYPE « PATTES FENDUES » DES EMBRYONS DE SOURIS DLX5/6 ^{-/-}	48
➤	FIGURE 19 : EXPRESSION DE DLX5 ET DLX6 DANS LES CELLULES DE LEYDIG CHEZ LA SOURIS	48
➤	FIGURE 20 : PHENOTYPE « TESTICULAIRE » DES EMBRYONS DE SOURIS DLX5/6 ^{-/-}	49
➤	FIGURE 21. PHENOTYPE OVARIEN DES SOURIS DLX5/6 ^{+/-}	51
➤	FIGURE 22 : STRUCTURE DU GENE FOXL2.....	52
➤	FIGURE 23 : ALIGNEMENT DE LA SEQUENCE PROTEIQUE DE FOXL2 CHEZ LES VERTEBRES	53
➤	FIGURE 24: EXPRESSION DE FOXL2 DANS LE MESENCHYME PERI-OCULAIRE	54
➤	FIGURE 25: PROFIL D'EXPRESSION DE FOXL2 DANS L'HYPOPHYSE.....	54
➤	FIGURE 26 : PROFIL D'EXPRESSION DE FOXL2 DANS LES GONADES CHEZ LA SOURIS	55
➤	FIGURE 27: MALFORMATION DES PAUPIERES CHEZ DES PATIENTS BPES.....	57
➤	FIGURE 28: PHENOTYPE PALPEBRALE DES SOURIS FOXL2 ^{-/-}	58
➤	FIGURE 29: PHENOTYPE OVARIEN DES SOURIS FOXL2 ^{-/-}	58
➤	FIGURE 30 : REVERSION SEXUELLE DES GONADES XX DES MUTANTS CONDITIONNELS FOXL2.....	59
➤	FIGURE 31: INACTIVATION CONDITIONNELLE DE FOXL2 DANS L'HYPOPHYSE	60
➤	FIGURE 32: CIBLES TRANSCRIPTIONNELLES DE FOXL2 DANS L'HYPOPHYSE ET LES OVAIRES	61
➤	FIGURE 33: EXPRESSION DE FOXL2 DANS L'ENDOMETRE HUMAIN	62
➤	FIGURE 34: EXPRESSION DE FOXL2 DANS L'UTERUS BOVIN.....	63
➤	FIGURE 35: EXPRESSION DE FOXL2 DURANT L'IMPLANTATION A E5.5.....	129
➤	FIGURE 36: EXPRESSION DE FOXL2 DURANT LE CYCLE ŒSTRAL.....	130
➤	FIGURE 37: EXPRESSION DE DLX5 DURANT L'IMPLANTATION A E5.5.....	132
➤	TABLEAU 1: GENES IMPLIQUES DANS LE DEVELOPPEMENT DES CANAUX DE MÜLLER ET DE L'UTERUS.....	31

Liste des abréviations et symbole

AMH	Anti-Mullerian Hormone
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BPES	Syndrome de Blepharophimosis Ptôsis Epicanthus Inversus
CCNC	Cellules de la Crête Neurale Céphalique
CD	Cellule Déciduale
CHH	Complexe Hypothalamo-Hypophysaire
CMC	Cellules du Mésoderme Crânien
CME	Couche Musculaire Externe
CMI	Couche Musculaire Interne
CML	Cellule Musculaire Lisse
COUP-TFII	Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II
CS	Cellule Stromale
Dll	Distal-less
Dlx	Distal-less homeobox gene
Dvl	Dishevelled
E2	17 β -œstradiol
E10.5	stade de développement de l'embryon de souris (10,5 jours de développement)
EG	Epithélium Glandulaire
EGF	Epidermal Growth Factor
EL	Epithélium luminal
ER	Estrogen Receptor
Fgf9	Fibroblast Growth Factor 9
FMR1	Fragile Mental Retardation 1
Foxl2	Forkhead box L2
FSH	Folliculo Stimulating Hormone
Fzd	Frizzled
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
GU	Glande Utérine
HB-EGF	Heparin Binding EGF like growth factor
IGF	insulin Growth Factor
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IL	Interleukine
IOP	Insuffisance Ovarienne Précoce
JZ	Junctional Zone
lacZ	Gène bactérien codant la β -galactosidase
Lef	Lymphoid enhancer-binding factor
LH	Luteinising Hormone

LPS	<i>levator palpebrae superioris</i>
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LIFR	Récepteur du LIF
MeCP2	Methyl CpG binding protein
MnSOD	Manganese Super Oxyde Dismutase
Msx	Msh homeobox
NLS	Nuclear Localisation Signal
NOBOX	Newborn ovary homeobox
P4	Progésterone
P/D	Axe Proximo-Distal
PCR	Polymérase Chain Reaction
PIS	Polled/Intersex Syndrome
PN	Post Natal
PR	Progesterone Receptor
Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
qPCR	PCR quantitative
Rspo1	R-spondin 1
SHFM1	Split Hand/Foot Malformation
Sirt1	Sirtuine 1
SRY	Sex-determining Region of Y chromosome
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory
TCF	Transcription factor
TGFβ	Transforming Growth factor β
TGFBR1	Récepteur 1 au TGFβ
Tnfaip3	Tumor Necrosis Factor alpha-induced protein 3
TSH	Thyroid Stimulating Hormone
UGKO	Uterine Gland Knockout
Wnt	Wingless integration site

Introduction

La reproduction est l'ensemble des processus par lesquels une espèce se perpétue par la naissance de nouveaux organismes. C'est une des activités fondamentales partagées par toutes les espèces vivantes avec la nutrition et la croissance. La fonction reproductive est le pilier sur lequel repose la persistance de la vie au cours du temps. Cette fonction couvre un grand nombre de processus complexes allant du comportement au développement embryonnaire.

Dans mes travaux, je me suis intéressé à un de ces nombreux aspects qui est la formation des voies génitales féminines et en particulier le développement de l'utérus ; organe spécialisé des mammifères Euthérien dont la fonction est de permettre la nidation de l'embryon et son développement. Mes travaux ont été effectués chez la souris.

1. L'UTERUS : DEVELOPPEMENT ET FONCTION

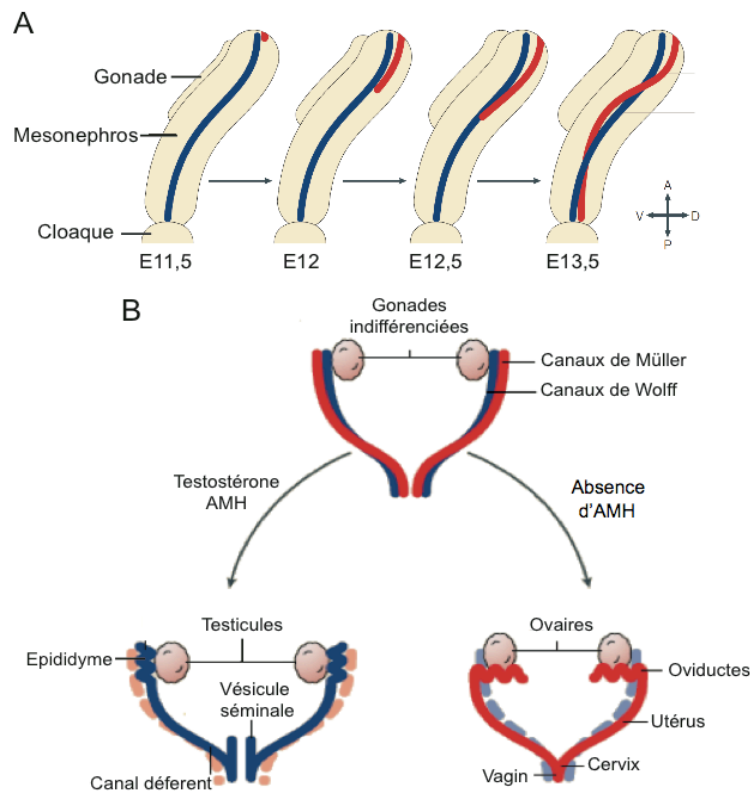
1.1. Les voies génitales féminines

1.1.1. Formation et différenciation des voies génitales

Chez les mammifères, les voies génitales se forment durant l'embryogenèse à partir du mésoderme intermédiaire. Elles sont formées initialement comme une partie du système urogénital qui comprend les reins, les gonades, les tractus urinaire et reproductif (Cunha 1975, Kobayashi *et al.* 2003). Après la gastrulation, le mésoderme intermédiaire prolifère et certaines cellules effectuent une transition du type mésenchymato-épithélial pour générer les tubules qui composent les canaux de Wolff et le canaux de Müller (Masse *et al.* 2009, Kurita 2011). Les voies génitales femelles se développent à partir des canaux de Müller et les voies génitales mâles se forment à partir des canaux de Wolff. Les canaux de Wolff se forment en premier. Ensuite, les canaux de Müller se développent par un bourgeonnement de l'épithélium de surface antérieure du mésonéphros. Ce bourgeonnement forme un canal par invagination épithéliale et s'étend caudalement guidé dans sa progression par les canaux de Wolff. Les canaux de Müller vont s'allonger latéralement puis médialement où les deux parties droite et gauche vont fusionner au niveau du sinus urogénital (Figure 1). Selon les espèces de mammifères, cette fusion va être plus ou moins antérieure. Elle est spécifique à l'espèce et elle définit la morphologie de l'utérus (simplex, bicorné, ou duplex). Chez la souris, cette fusion

est partielle, ce qui conduit à la formation d'un utérus bicorne permettant l'implantation simultanée de plusieurs embryons. Chez les primates, cette fusion est plus antérieure, aboutissant à la formation d'un utérus simple (Kobayashi *et al.* 2003, Spencer *et al.* 2005).

Chez la souris, l'appareil génital reste indifférencié jusqu'à 13,5 jours de développement (E13.5) où il est constitué des deux canaux et de deux gonades indifférenciées. Dans le cas où l'embryon est une femelle, l'absence d'hormone anti-Müllerienne (AMH) sécrétée par le testicule va permettre la persistance des canaux de Müller et l'absence d'androgènes va permettre la régression des canaux de Wolff (Figure 1). Ces derniers donneront naissance aux voies génitales femelles composées des oviductes (ou trompes de Fallope), de l'utérus, du cervix (ou col de l'utérus) et de la portion haute du vagin par fusion de la partie inférieure des deux canaux de Müller (Cunha 1975).



➤ **Figure 1: Formation des canaux de Müller et différenciation sexuelle chez la souris**

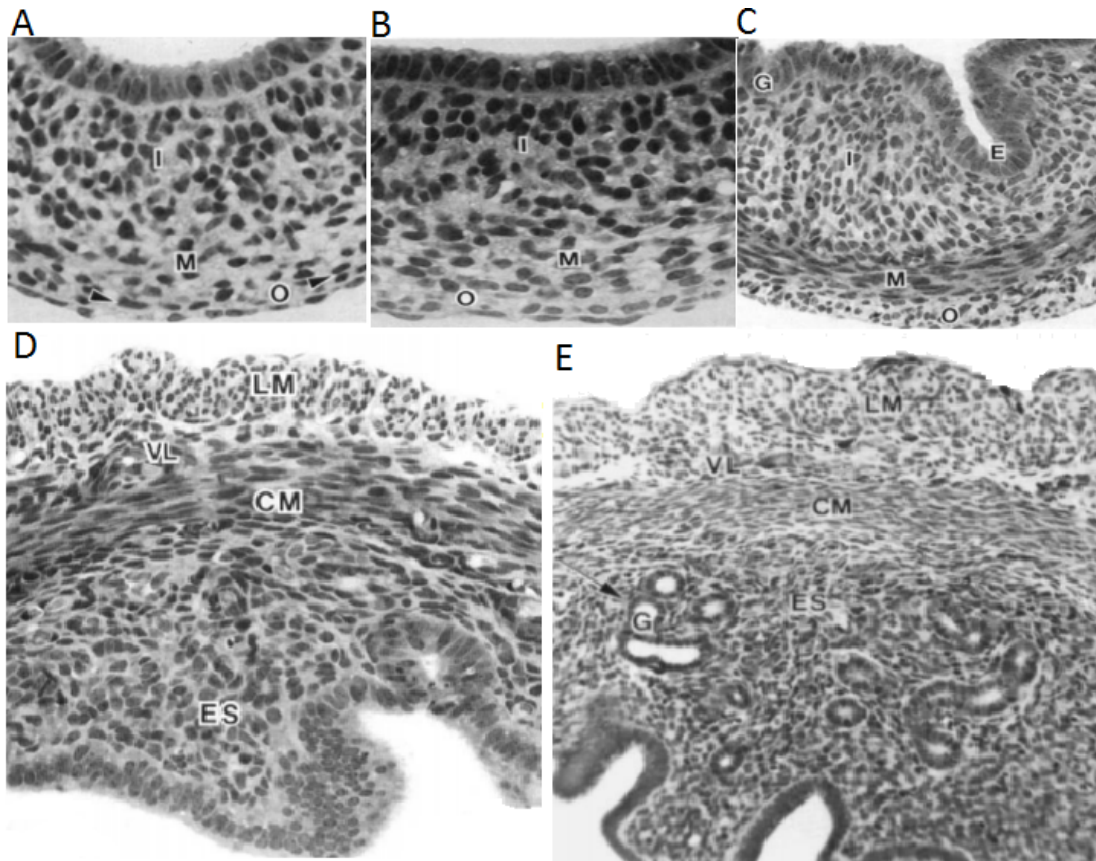
A : Formation des canaux de Müller (rouge) et migration le long des canaux de Wolff (bleu). B ; Différenciation des voies génitales de E13.5 à E15.5. A E13.5 les deux canaux sont présents (haut). La différenciation des gonades permet la différenciation des voies génitales. La production d'AMH par les testicules provoque la régression des canaux de Müller et la persistance des canaux de Wolff chez le mâle, et la testostérone permet leur développement (gauche) et l'absence de ces facteurs conduit par défaut, à la persistance des canaux de Müller (droite). Adapté de (Kobayashi *et al.* 2003).

1.1.2. Maturation post-natale de l'utérus chez la souris

1.1.2.1. Maturation histologique

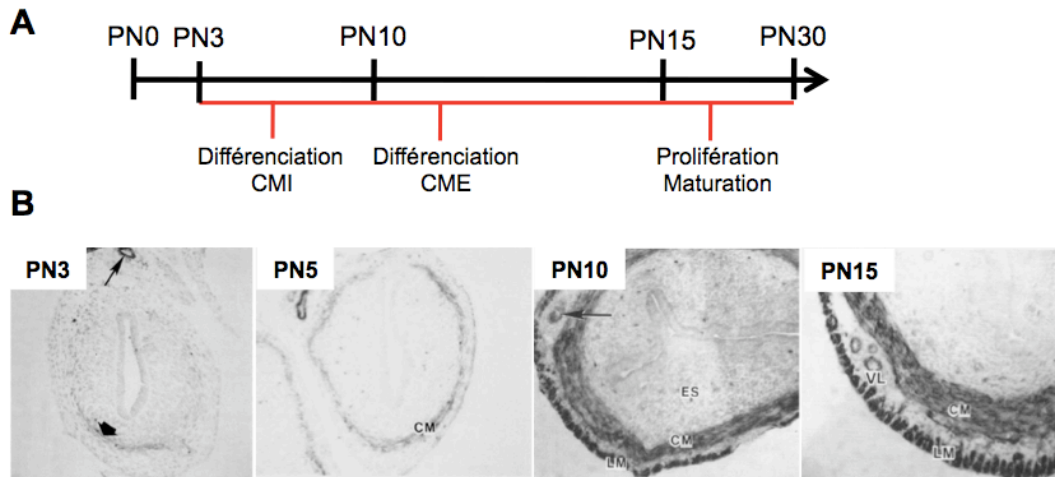
Chez les mammifères placentaires, l'utérus est composé de différentes couches tissulaires : i) l'endomètre, composé d'un épithélium luminal et glandulaire et de cellules stromales, ii) du myomètre, constitué d'une couche périphérique interne et d'une couche longitudinale externe, puis iii) d'une couche de cellules séreuses périmétriale. Cette morphologie adulte résulte d'un long processus de maturation, principalement post-natal.

Chez la souris, l'utérus des nouveaux-nés est composé d'un épithélium luminal simple et une épaisse couche de cellules mésenchymateuses indifférenciées qui sont entourées par des cellules séreuses du périmétrium (Figure 2). De la naissance à 3 jours post-natal (PN3), les cellules de l'épithélium luminal (EL) au départ cubique s'allongent pour devenir colonnaires simple (Cunha 1975). Durant la même période, les cellules mésenchymateuses se réorientent et forment trois couches : la couche interne (orientation circulaire), la couche médiane et la couche externe (orientation longitudinale) (Figure 2) (Brody *et al.* 1989). A PN5, les cellules du mésenchyme se différencient régionalement. Les cellules situées à proximité de l'épithélium se différencient en cellules stromales fibroblastiques (CS) tandis que les cellules les plus distales se différencient en cellules musculaires lisses (CML). Ces dernières forment premièrement la couche myométriale interne (CMI), puis de la couche myométriale externe (CME) à PN10. Ces deux couches sont séparées par une couche vasculaire (Figure 2 et Figure 3).



➤ **Figure 2** *Maturation post-natale de l'utérus murin.*

Coloration histologique sur des coupes coronales d'utérus de souris à différents stades de la maturation post-natale. A) PN0 B) PN3. Les cellules du mésenchyme se séparent en différentes couches, les cellules de la couche interne (I) ont une orientation aléatoire, les cellules de la couche médiane (M) s'orientent de manière circulaire. C) PN5. Les cellules de la couche médiane (M) commencent à se différencier en cellules musculaires. Les cellules de la couche externe (O) s'orientent de manière longitudinale, les cellules de l'épithélium (E) s'allongent et des bourgeonnements de l'épithélium apparaissent pour former des glandes utérines (G). D) PN15. Les différentes couches histologiques sont formées. On distingue le stroma (ES), les deux couches musculaires (CM et LM) et la couche vasculaire (VL). E) Chez l'adulte. Les différentes couches cellulaires augmentent et le nombre de glandes (G) croît. I : couche interne, M : couche médiane, O : couche externe, G : glande utérine, E : épithélium, LM : myomètre longitudinal ou couche myométriale externe, VL : couche vasculaire, CM : myomètre circulaire ou couche myométriale interne, ES : stroma. D'après (Brody et al. 1989).

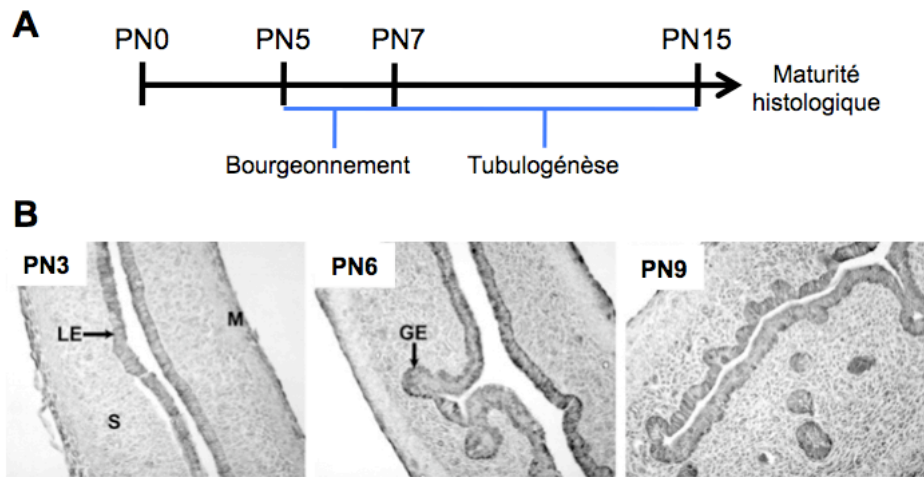


➤ **Figure 3: Développement du myomètre chez la souris**

A : Chronologie du développement des différentes couches du myomètre. PN : jour de développement post-natal, CMI : Couche musculaire interne, CME : Couche musculaire externe. B : Immunohistochimie anti-SMA α montrant les cellules musculaires lisses différenciées durant le développement post-natal. D'après (Brody et al. 1989).

A partir de PN5, des invaginations de l'EL donnent naissance aux glandes utérines (GU) observables dès PN7 (Brody *et al.* 1989, Kurita *et al.* 2001). Ces invaginations se forment par bourgeonnement de l'EL à partir d'une cellule épithéliale (origine monoclonale) qui pénètre dans le stroma, prolifère et forme des glandes tubulaires simples (Figure 4). Par rétrécissement de la face apicale, l'épithélium glandulaire (EG) prend une orientation circulaire permettant la forme tubulaire (Gray *et al.* 2001).

A PN15 les différents tissus caractéristiques de l'utérus sont présents. L'endomètre est constitué de l'EL, des CS et des GU. Le myomètre est composé des CML et des vaisseaux sanguins. Le périmétrium est également présent. L'utérus possède sa structure définitive si ce n'est que le nombre de GU augmente et que le stroma prolifère jusqu'à la maturité sexuelle à PN30 (Brody *et al.* 1989).



➤ **Figure 4: Développement des glandes utérines chez la souris**

A : Chronologie de la formation des glandes utérines durant le développement post-natal. PN : jour de développement post-natal. D'après Gray et al. 2001. B : Immunohistochimie CAR2 marquant l'épithélium durant la formation des glandes utérines sur des coupes sagittale d'utérus murin. GE : glande utérine, M : myomètre, LE : épithélium luminal. D'après Hu et Spencer 2005.

Chez l'adulte, le myomètre de part ces contractions a de multiple fonctions. Il permet l'ascension des spermatozoïdes après l'accouplement, la répartition des embryons lors de l'implantation et l'expulsion du fœtus lors de la parturition (Bartol *et al.* 1999, Spencer *et al.* 2005). Les GU, elles, ont un rôle primordial dans plusieurs espèces étudiées (vache, cochon, mouton, souris ou rat) car elles sont nécessaires à l'implantation embryonnaire. En effet, l'absence de glandes provoque une infertilité chez les modèles UGKO (uterine gland knock out) ovins, caprins ou murins, induits par des traitements hormonaux néonataux (Gray *et al.* 2001, Cooke *et al.* 2012). Les GU synthétisent et secrètent de multiples facteurs comme des enzymes, des facteurs de croissance, des cytokines et des nutriments qui permettraient un premier support nutritif à l'embryon et participeraient aux processus d'implantation embryonnaire. Cependant, le rôle exact et les mécanismes d'action de ces facteurs restent actuellement encore mal connus. L'un des plus cité est le Leukemia Inhibitory Factor (LIF), une cytokine de la famille de l'IL-6, qui est produit par les GU juste avant l'implantation embryonnaire. En effet, l'absence de LIF dans l'utérus chez les souris *Lif*^{-/-} conduit à une infertilité qui est rétabli après l'injection de LIF recombinant suggérant un rôle majeur de cette molécule (Stewart *et al.* 1992) dans le processus d'implantation.

1.1.2.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation post-natale utérine

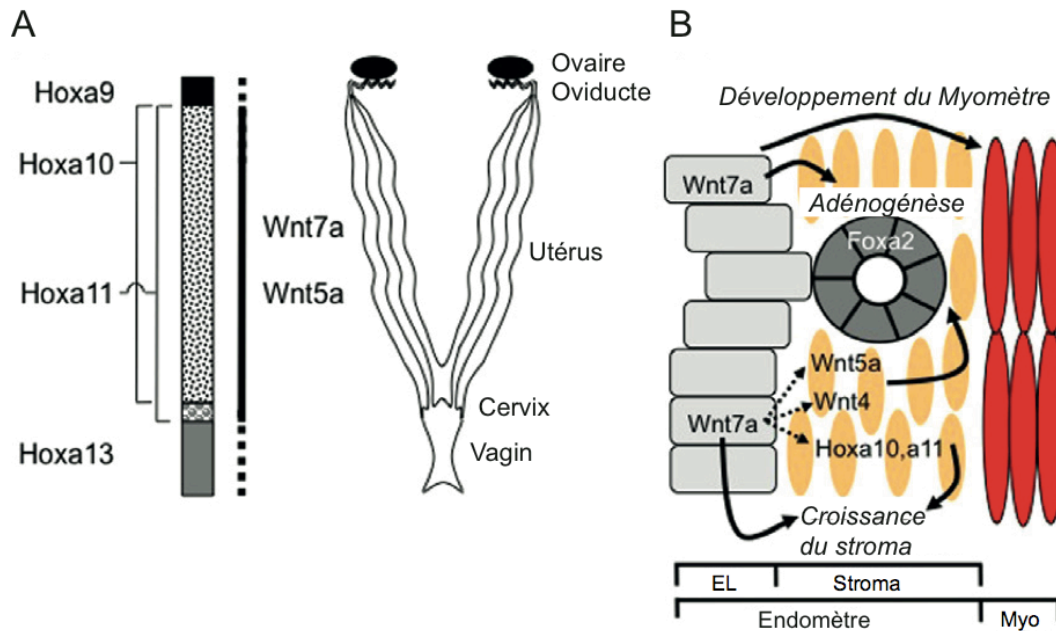
1.1.2.2.1. Interactions épithélium-mésenchyme

Les travaux de Cunha et coll. ont montré que les mécanismes de la maturation de l'utérus dépendent des interactions entre le mésenchyme et l'épithélium. Dans une première étude, cette équipe a montré l'importance de l'épithélium sur le développement du myomètre utérin. Dans ces travaux, cette équipe a greffé sur la capsule rénale des tissus utérins néonataux recombinaés, comprenant soit du mésenchyme seul, soit du mésenchyme avec de l'épithélium provenant d'utérus de différents âges. Les résultats ont montré que l'absence d'épithélium ne conduisait qu'à la formation d'un myomètre rudimentaire, alors que la présence de l'épithélium quelque soit l'âge du donneur permettait la formation complète du myomètre (Cunha *et al.* 1989, Cunha *et al.* 1992). Une autre étude de la même équipe a montré cette fois, l'influence du mésenchyme sur la différenciation de l'épithélium en utilisant la même technique, mais cette fois avec des mésenchymes utérins ou vaginaux recombinaés avec des épithéliums utérins ou vaginaux. Ils ont montré que le mésenchyme utérin, entre PN2 et PN7, induit la différenciation de l'épithélium en épithélium utérin quelque soit son origine. Cela suggère que des signaux provenant du mésenchyme utérin permettent la différenciation épithéliale (Cunha 1976). Cette étude supporte l'idée que des facteurs diffusibles provenant de l'épithélium et du mésenchyme régulent la morphogénèse via des signaux paracrines, juxtacrines et peut-être même autocrines. Même si la nature de ces facteurs reste évasive, de nombreuses études ont permis de démêler les mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation utérine.

1.1.2.2.2. Les gènes Hoxa : implication dans la segmentation des voies génitales

Les gènes *Hox* codent pour des facteurs de transcription à homéodomaines très conservés. Leur expression est nécessaire à l'établissement du plan du corps chez les métazoaires et ils régulent des voies de signalisation aboutissant au développement et à la différenciation embryonnaire. Ils confèrent notamment l'identité aux différents segments embryonnaires (Favier *et al.* 1997). La différenciation de l'axe antéropostérieur des canaux de Müller est régulée par la famille des gènes *Hoxa*. Chez la souris, les gènes du cluster *Hoxa* : *Hoxa9*, *Hoxa10*, *Hoxa11* et *Hoxa13*, présents sur le chromosome 6, sont exprimés dans leur ordre 3'-5' le long de l'axe antéropostérieur dans le mésenchyme des canaux de Müller (Figure 5A)

(Hsieh-Li *et al.* 1995, Gendron *et al.* 1997, Taylor *et al.* 1997, Kitajewski *et al.* 2000). Ainsi, durant la différenciation et chez l'adulte, l'expression de ces gènes est segmentée: *Hoxa9* est exprimé dans les oviductes, *Hoxa10* et *Hoxa11* dans l'utérus et *Hoxa13* dans le cervix et le vagin antérieur (Taylor *et al.* 1997, Kitajewski *et al.* 2000).



➤ **Figure 5: Les gènes Hox et Wnt durant la morphogénèse prénatale et la maturation post-natale utérine**

A : A la naissance les domaines d'expression des gènes Hoxa se régionalisent le long de l'axe antéro-postérieur des voies reproductives femelles. La régionalisation de l'expression d'*Hoxa10* précède légèrement celle des gènes *Wnt7a* et *Wnt5a* qui se fait quelques jours après la naissance. B : Hypothèse du rôle des gènes Wnt et Hoxa dans la formation des glandes utérines et la croissance du stroma durant la maturation post-natale utérine. *Wnt7a* est requis pour la maintenance (flèches en pointillées) d'un haut niveau de *Wnt5a*, *Wnt4*, *Hoxa10* et *Hoxa11*. Le signal de *Wnt5a* coopère avec un facteur inconnu pour induire la répression de *Wnt7a* requise dans l'épithélium luminal pour la formation des glandes utérines. Adapté de (Spencer *et al.* 2005).

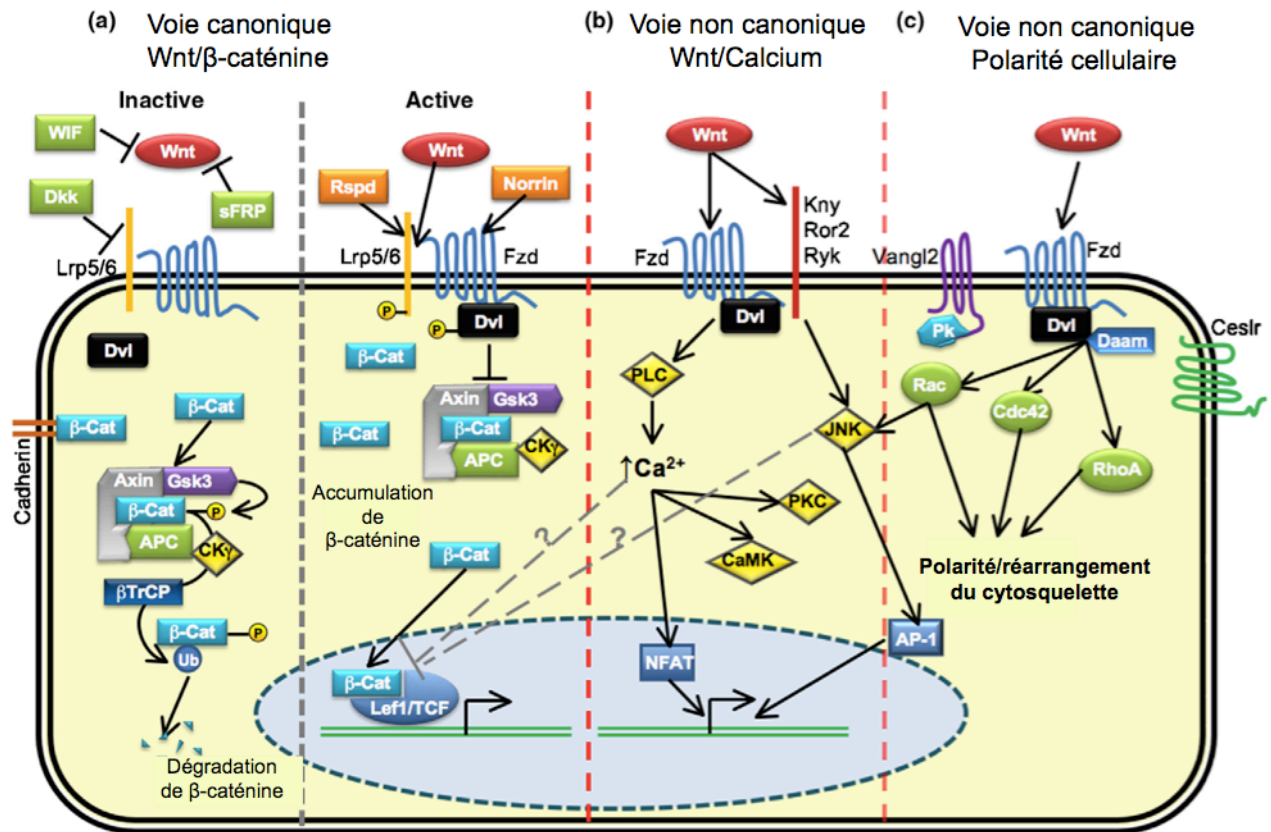
Cette expression segmentaire est nécessaire à la formation correcte des différentes composantes des voies génitales. En effet, il a été montré que l'absence d'*Hoxa10* provoque la transformation homéotique de la partie supérieure de l'utérus en oviducte (Benson *et al.* 1996) et que l'absence d'*Hoxa11* induit également une transformation partielle de l'utérus en oviducte (Gendron *et al.* 1997). Le remplacement de l'homéodomaine d'*Hoxa11* par celui d'*Hoxa13*, normalement exprimé dans le cervix, résulte en une posteriorisation de l'utérus qui ressemble à une structure cervico-vaginale suggérant que l'action des Hox se fait par l'homéodomaine (Mark *et al.* 1997, Zhao *et al.* 2001). De plus, il a été vu chez d'autres souris mutantes (*Wnt7a*^{-/-}, décrites plus loin), qui possèdent une diminution de la taille du stroma,

une diminution de l'expression d'*Hoxa10* et *Hoxa11*, indiquant que le maintien d'un haut niveau d'expression de ces gènes est nécessaire à la croissance du stroma durant la maturation utérine (Figure 5B) (Mericskay *et al.* 2004).

1.1.2.2.3. Les gènes *Wnt*, implications dans la formation des glandes utérines et dans le développement du myomètre

Les gènes *Wnt* (Wingless integration site) codent pour des glycoprotéines sécrétées dans le milieu extracellulaire. Elles jouent un rôle durant l'embryogénèse et l'homéostasie des tissus adultes. Les voies de signalisation des *Wnt* sont multiples. Classiquement, on distingue la voie canonique et les voies non-canoniques. Toutes ces voies de signalisation impliquent la liaison de *Wnt* à un récepteur membranaire de la famille des Frizzled (*Fzd*) dont la transduction du signal passe par la protéine Dishevelled (*Dvl*). La voie de signalisation canonique permet la stabilisation de la β -caténine et son accumulation cytoplasmique qui agit après sa translocation nucléaire comme co-activateur des facteurs de transcriptions *Tcf/Lef* et permettent la régulation de gènes cibles. La voie non-canonique dite de polarité cellulaire régule la conformation du cytosquelette et la voie non-canonique *Wnt/calcium* régule la concentration calcique intracellulaire (Cadigan *et al.* 2009) (Figure 6).

De nombreux membres des *Wnt* sont exprimés dans l'utérus dès la naissance comme *Wnt4*, *Wnt5a*, *Wnt7a*, *Wnt7b*, *Wnt10b*, *Wnt11* et *Wnt16* (Miller *et al.* 1998, Miller *et al.* 1998, Hayashi *et al.* 2011). *Wnt4* est exprimé dans tous les types cellulaires. *Wnt5a* et *Wnt16* sont exprimés dans le stroma. *Wnt7a* et *Wnt7b* dans l'EL et les EG superficiels. *Wnt11* s'exprime dans l'EL et l'EG (Hayashi *et al.* 2011). Leurs récepteurs *Fzd6* et *Fzd10* sont détectés dans l'épithélium (Hayashi *et al.* 2011). Chez l'adulte, le niveau et les sites d'expression de *Wnt* fluctuent durant le cycle oestral, suggérant un rôle continu durant la différenciation fonctionnelle de l'utérus (Miller *et al.* 1998, Miller *et al.* 1998). De nombreuses études ont pu montrer que la présence des *Wnt* jouait un rôle majeur dans la maturation post-natale de l'utérus.



➤ **Figure 6 : Voies de signalisation des Wnt**

Trois principales voies de signalisation des Wnt : (a) la voie canonique Wnt/β-caténine, (b) et (c) les voies non-canoniques incluant (b) la voie Wnt/calcium dépendante et (c) la voie Wnt/polarité cellulaire. (a) Dans les cellules la β-caténine est normalement associée aux jonctions adhérentes et peut être cytoplasmique. En absence de stimulation par Wnt, la β-caténine est dégradé par sa phosphorylation par le complexe APC–Axin–GSK3b–CK1γ et son ubiquitination, entraînant sa dégradation par le protéasome. En présence du signal Wnt qui se lie à Fzd et à son corécepteur Lrp5/6, recrute Dvl qui inhibe la formation du complexe APC–Axin–GSK3b–CK1γ. La β-caténine s'accumulant dans le cytoplasme peut entrer dans le noyau et activé ses gènes cibles par son association avec la famille de facteurs de transcription Tcf/Lef1. (b) La voie non-canonique Wnt/calcium, passe par la liaison de Wnt à Fzd, qui peut provoquer une augmentation du calcium intracellulaire par l'activation de la PLC, cela activant la CAMK et la PKC dans la cellule. De plus, Fzd en association avec les récepteurs Kny, Ror2 ou Ryk peut aussi activer la JNK qui peut activer AP-1. (c) La voie non-canonique Wnt/polarité cellulaire est caractérisée par la distribution asymétrique de Fzd, CELSR, Pk et Vangl2, qui permet la polarisation cellulaire. Wnt active aussi les GTPase Rho Cdc42, RhoA et Rac1 qui provoquent des réarrangements du cytosquelette par la participation de Daam1. Rac1 peut aussi activer la JNK qui agit sur la régulation de gènes par AP-1. D'après (Franco et al. 2009).

Chez la souris, des mutations impliquant les gènes *Wnt5a* et *Wnt7a* empêchent la formation des glandes utérines (Miller *et al.* 1998, Mericskay *et al.* 2004). L'absence de *Wnt7a* provoque un phénotype complexe : les souris mutantes *Wnt7a*^{-/-} sont viables mais infertiles. Elles ont un utérus hypoplasique dépourvu de GU dont le stroma est réduit et le myomètre est hypertrophique et désorganisé (Miller *et al.* 1998, Parr *et al.* 1998). De plus, l'EL des ces

mutants devient graduellement squameux à partir de 3 mois se rapprochant d'un épithélium vaginal (Miller *et al.* 1998). Chez ces mutants, on observe que les expressions de *Hoxa10*, *Hoxa11* et *Wnt4* sont affectés, suggérant que *Wnt7a* régulerait ces cibles au niveau du stroma, ce qui expliquerait la diminution de croissance observée de ce dernier (Miller *et al.* 1998). Pour mieux comprendre le rôle de *Wnt7a*, des équipes ont utilisé une approche d'inactivation conditionnelle. L'inactivation post-natale de *Wnt7a* dans l'utérus sous le contrôle du récepteur de la progestérone (Pgr), actif dès PN3, affecte aussi l'expression d'*Hoxa10*, *Hoxa11*, *Wnt4*, mais aussi l'expression de *Wnt5a*, *Wnt11* et *Wnt16*, indiquant un réseau de régulation complexe entre ces gènes dont *Wnt7a* serait l'initiateur (Figure 5B). Ces mutants conditionnels ont une absence de développement des GU ce qui confirme l'importance de *Wnt7a* dans leur formation. Cependant, l'épithélium et la couche musculaire ne sont pas affectés, au contraire de ce que l'on observe chez des souris *Wnt7a*^{-/-}. Ceci suggère que l'action de ce gène sur le développement du myomètre et sur l'épithélium est antérieure à PN3 (Dunlap *et al.* 2011).

Wnt5a, quant à lui, est exprimé dans le mésenchyme utérin sous-jacent à l'épithélium. Les souris invalidées pour *Wnt5a* meurent à la naissance due à un défaut de formation de l'axe antéropostérieur (Yamaguchi *et al.* 1999). Des techniques de greffe des voies génitales sur la capsule rénale ont permis d'observer qu'après leur maturation, les voies génitales issues des souris *Wnt5a*^{-/-} sont courtes et enroulées et que l'utérus ne possède pas de GU. Ceci souligne que *Wnt5a* est aussi requis pour la formation des GU (Mericskay *et al.* 2004). Mericskay et coll. ont proposé qu'une répression localisée de *Wnt7a* par *Wnt5a* dans l'épithélium luminal provoquerait la différenciation et l'invagination de l'EL à l'origine des GU. Les analyses de chimères chez la souris suggèrent que les glandes ont une origine monoclonale (Lipschutz *et al.* 1999), montrant que la répression de *Wnt7a* pourrait se faire dans une seule cellule qui donnerait naissance à une glande. *Wnt5a* étant exprimé tout le long du mésenchyme, cela suggère qu'un facteur supplémentaire est requis pour inhiber *Wnt7a*, cependant, son origine reste inconnue.

Dans le but de mieux comprendre le rôle de la signalisation Wnt dans le développement utérin, des études ont entrepris de cibler l'expression de la β -caténine (Ctnnb1), un élément clef de la voie de signalisation canonique de Wnt. L'inactivation conditionnelle de la β -caténine en utilisant la Pgr-Cre, provoque une absence de GU (Jeong *et al.* 2009). Au

contraire, la stabilisation de la β -caténine qui induit une activation constitutive de la voie Wnt provoque des hyperplasies glandulaires (Jeong *et al.* 2009). Ces résultats indiquent que la voie canonique des Wnt est impliquée dans le processus de formation des GU, appuyant l'hypothèse que Wnt5a et Wnt7a agiraient par cette voie. De plus, la stabilisation de la β -caténine induit aussi une hypertrophie myométriale et la présence de glandes dans le myomètre (Tanwar *et al.* 2009, Oh *et al.* 2013). De la même manière, l'inactivation d'APC (Adenomatosis Polyposis Coli), une protéine permettant la destruction de la β -caténine, provoque également des défauts de formation du myomètre, qui est discontinu et désorganisé (Wang *et al.* 2011). Ces données suggèrent que l'effet de Wnt7a sur le développement du myomètre passerait également par cette voie. L'ensemble de ces études montrent un contrôle fin, complexe et interactif des Wnts sur la maturation post-natale utérine, qui est maintenue par la voie d'activation canonique permettant à la fois la formation des GU et l'organisation de la couche myométriale (Kurita 2011).

1.1.2.2.4. Les autres gènes impliqués dans le développement post-natale

D'autres gènes sont connus pour être impliqués dans la formation des glandes utérines, notamment le gène *Foxa2*, codant pour un facteur de transcription, a un rôle important dans la formation des bourgeonnements épithéliaux et la morphogénèse d'autres organes épithéliomésenchymateux (Besnard *et al.* 2004, Kaestner 2010). Dans l'utérus, son inactivation conditionnelle conduit à une absence totale de GU confirmant son importance dans la formation de celles-ci (Jeong *et al.* 2010). De plus, chez les mutants conditionnels *Wnt7a* dans l'utérus, *Foxa2* n'est pas exprimé, suggérant que Wnt7a pourrait agir en amont de *Foxa2* dans la cascade régulant la formation des glandes utérines.

Récemment, une étude a montré que l'action des TGF β (facteur de croissance transformant beta), des cytokines impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaire, permettent le développement du myomètre durant la maturation utérine (Gao *et al.* 2014). L'inactivation de son récepteur TGFBR1 provoque de sévères défauts de formation et de configuration du myomètre, celui-ci est fin et désorganisé. Cette étude montre que les défauts de formation de l'utérus observés chez les mutants ne sont pas dus à une altération de l'expression de gènes de la différenciation musculaire, mais s'apparentent plutôt à un défaut d'expression des protéines de matrice extracellulaire et une perturbation de la migration cellulaire durant une phase critique du développement. L'activation constitutive de TGFBR1, au contraire, provoque une

hypertrophie du myomètre, par une augmentation de l'expression de marqueurs musculaires et un défaut de formation des GU qui serait due à l'hypertrophie musculaire. Ces résultats montrent l'importance d'un contrôle précis du signal TGFβ dans l'établissement du microenvironnement utérin permettant un développement normal du myomètre (Gao *et al.* 2015).

1.1.2.2.5. L'effet des œstrogènes sur le développement post-natale

Des études ont montré que le développement post-natal utérin se fait indépendamment des stéroïdes ovariens car l'utérus des souris ovariectomisées se développe normalement (Clark *et al.* 1970, Gray *et al.* 2001). De la même manière, l'utérus des souris invalidées pour le récepteur des œstrogènes *ERα* possède des utérus histologiquement normaux. Cependant, les différentes couches cellulaires sont présentes dans des proportions réduites, montrant que *ERα* n'est pas essentiel pour l'organogenèse du tissu, mais pour sa croissance (Lubahn *et al.* 1993). De nombreuses études ont pu montrer que l'administration précoce d'œstrogènes ou de certains agonistes du récepteurs des œstrogènes perturbe la maturation post-natale utérine. Par exemple, les traitements néonataux par le diéthylstilbestrol (distilbène – DES), un agoniste du récepteur des œstrogènes, provoquent une désorganisation du myomètre, ainsi qu'une stratification de l'EL et une absence de GU (Brody *et al.* 1989). L'expression de *Wnt4*, *Wnt5a*, *Wnt7a*, *Wnt11* et *Wnt16* et des gènes *Hoxa* est réduite ou supprimée chez ces animaux, expliquant ainsi les défauts de développement observés (Ma *et al.* 1998, Hayashi *et al.* 2011). Ceci montre que les œstrogènes ne sont pas essentiels à la spécification des différentes couches utérines lors du développement précoce de l'utérus. En revanche, l'activation précoce des cascades de signalisation de ces hormones perturbe le processus de maturation.

Gènes	Expression spatio-temporelle des gènes	Phénotype des mutants KO (N) ou Conditionnels (C)	Références bibliographiques
<i>Wnt4</i>	Canaux de Müller Utérus néonatal EM, MM ST	Aucune VG (N), pas de GU (C), diminution de la fertilité (C)	(Miller <i>et al.</i> 1998, Vainio <i>et al.</i> 1999, Franco <i>et al.</i> 2011)
<i>Wnt5a</i>	EM, MM ST	Croissance réduite dans la partie postérieure des CM (N), pas de GU (N)	(Miller <i>et al.</i> 1998, Mericskay <i>et al.</i> 2004)
<i>Wnt7a</i>	EM EL	Postériorisation des CM (N), EL pluristratifié (N), hypertrophie du myomètre (N), pas de GU (N et C)	(Miller <i>et al.</i> 1998, Parr <i>et al.</i> 1998, Carta <i>et al.</i> 2004, Dunlap <i>et al.</i> 2011)
<i>Wnt7a</i>	EM EL	Postériorisation des CM (N), EL pluristratifié (N), hypertrophie du myomètre (N), pas de GU (N et C)	(Miller <i>et al.</i> 1998, Parr <i>et al.</i> 1998, Carta <i>et al.</i> 2004, Dunlap <i>et al.</i> 2011)

Gènes	Expression spatio-temporelle des gènes		Phénotype des mutants KO (N) ou Conditionnels (C)	Références bibliographiques
	Canaux de Müller	Utérus néonatal		
<i>Wnt11</i>	?	EL, EG	Aucun (C)	(Hayashi <i>et al.</i> 2011)
<i>Wnt16</i>	?	ST	?	(Hayashi <i>et al.</i> 2011)
<i>Fzd6</i>	?	EL, EG	?	(Hayashi <i>et al.</i> 2011)
<i>Fzd10</i>	?	EL, EG	?	(Hayashi <i>et al.</i> 2011)
<i>Cttnb1</i>	tout	tout	Utérus hypotrophique et enroulement des oviductes défectueux (C), myogenèse remplacé par de l'adipogénèse (C), pas de GU.	(Arango <i>et al.</i> 2005, Jeong <i>et al.</i> 2009)
<i>Hoxa10</i>	MM	ST	Transformation homéotique de la partie antérieure de l'utérus en oviducte (N)	(Benson <i>et al.</i> 1996, Branford <i>et al.</i> 2000)
<i>Hoxa11</i>	MM	ST	Transformation homéotique partielle de la partie antérieure de l'utérus en oviducte (N), utérus hypoplasique et diminution des GU (N)	(Gendron <i>et al.</i> 1997, Branford <i>et al.</i> 2000, Zhao <i>et al.</i> 2001)
<i>Hoxa13</i>		aucune	Agénésie de la portion caudale des CM	(Warot <i>et al.</i> 1997)
<i>Foxa2</i>	?	EG	Pas de GU (C)	(Jeong <i>et al.</i> 2010)

➤ **Tableau 1: Gènes impliqués dans le développement des canaux de Müller et de l'utérus**

Adapté de (Spencer *et al.* 2012). ?: inconnu, C : mutant conditionnel, CM : canaux de Müller EG : épithélium glandulaire, EL : épithélium luminal, EM : épithélium müllerien, GU : glandes utérines MM : mésenchyme müllerien, N : mutant KO, ST : stroma.

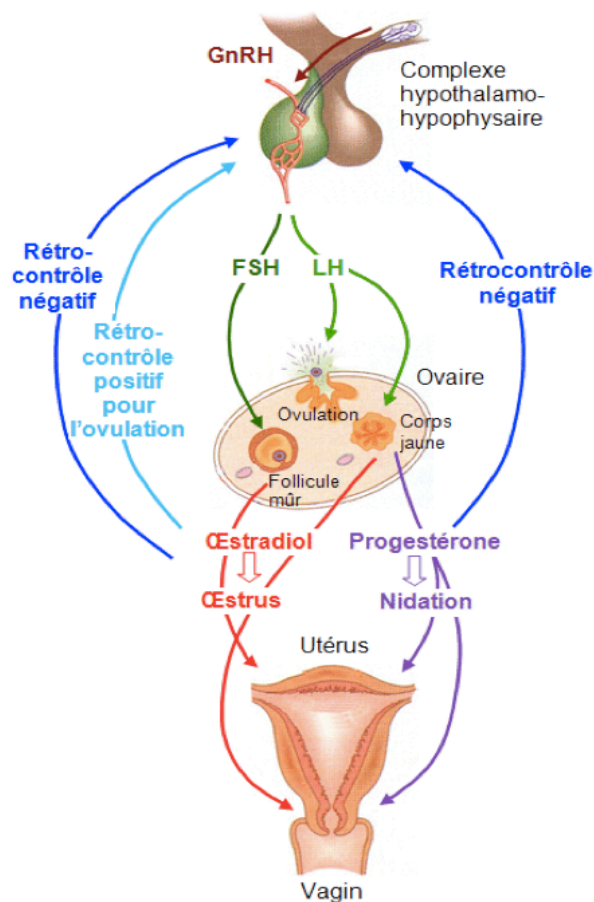
1.2. Fonction de l'utérus

1.2.1. Régulation hormonales

1.2.1.1. L'axe gonadotrope

Une fois la maturation sexuelle achevée (autour de 4 semaines chez la souris), l'ensemble du système reproductif est fonctionnel. L'axe gonadotrope comprend le complexe hypothalamo-hypophysaire (CHH) central et des gonades. L'hypothalamus sécrète une neuro-hormone, la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) qui agit *via* le système vasculaire porte hypothalamo-hypophysaire sur les cellules gonadotropes de l'adénohypophyse. La stimulation par la GnRH va induire la sécrétion de deux hormones : la FSH (Follicle Stimulating Hormone) et la LH (Luteinizing Hormone). Ces deux hormones, aussi appelées gonadotrophines, vont stimuler l'ovaire et entraîner la maturation folliculaire et la production de stéroïdes sexuels dont l'œstradiol (E2) et de la progestérone (P4), hormones essentielles à la fonction reproductive de l'utérus. En retour, les hormones ovariennes vont exercer un

rétrocontrôle sur la sécrétion de FSH et LH. L'œstradiol est produite par les follicules entrés en croissance. En milieu de cycle, la forte concentration en E2 dépassant un certain seuil exerce un rétrocontrôle positif sur le CHH induisant un pic de LH qui provoque l'ovulation du (des) (suivant les espèces de mammifères) follicule(s) arrivé(s) à maturité. Par la suite les cellules de la granulosa et de la thèque du follicule ovulé se différencient (lutéinisation) et constituent le corps jaune sécrétant de P4, qui exerce un rétrocontrôle négatif sur le CHH et qui va permettre la nidation de l'embryon en cas de fécondation (Figure 7). Si il y a fécondation, le corps jaune est maintenu, sinon celui-ci dégénère.

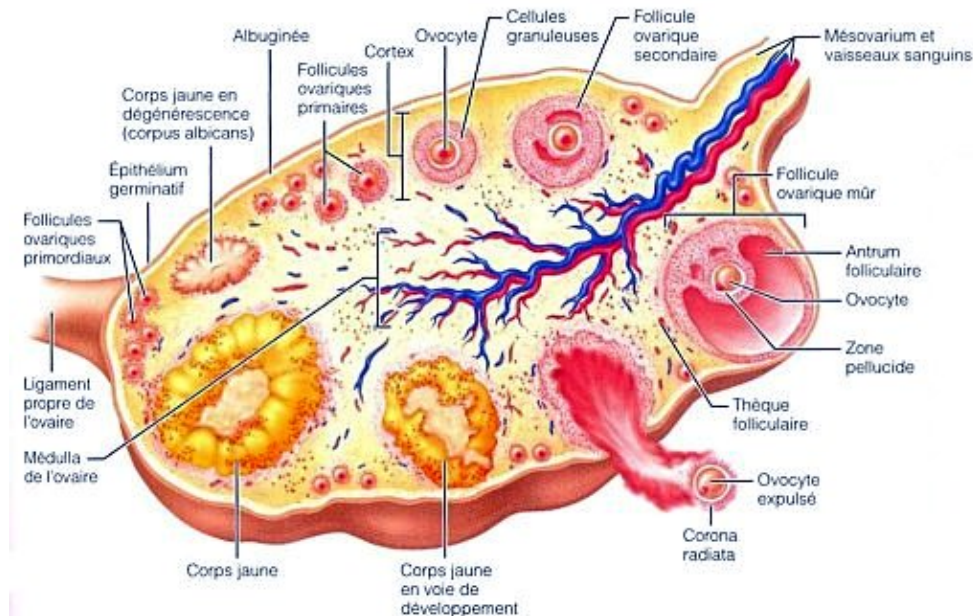


➤ **Figure 7: Axe gonadotrope et régulation hormonale chez la femelle**

La sécrétion de FSH stimule la croissance folliculaire produisant l'œstradiol qui exerce un rétrocontrôle négatif sur le CHH. Arrivé à maturité, les follicules produisent un taux élevé d'œstradiol qui va exercer un rétrocontrôle positif sur le CHH et déclencher un pic de LH, déclenchant l'ovulation à l'œstrus. Le follicule ovulé se transforme en corps jaune qui produit la progestérone et exerce un rétrocontrôle négatif sur le CHH. L'œstradiol et la progestérone permettent les modifications de l'utérus nécessaires à la nidation de l'embryon. D'après http://www.bio-top.net/Transmission_vie/6_determinisme.htm.

1.2.1.2. Le Cycle œstral

Les processus de reproduction chez les femelles mammifères sont caractérisés par des modifications cycliques dans le tractus génital. L'ensemble de ces changements est appelé cycle œstral. Chez la souris, le cycle œstral est divisé en quatre phases: le proœstrus, l'œstrus, le metœstrus et le dioœstrus. Au niveau ovarien, le proœstrus correspond à la croissance et à la maturation folliculaire. L'œstrus correspond à la phase de réceptivité de la femelle et conduit à l'ovulation, c'est à dire, à l'expulsion d'un ovocyte mature. Le metœstrus correspond lui, à l'organisation fonctionnelle du corps jaune avec production de la progestérone. Le dioœstrus, enfin, correspond à la phase lutéale. La durée de ces cycles est d'environ 4-5 jours chez la souris.



➤ **Figure 8 : Structure de l'ovaire adulte chez la souris**

Schéma représentant une coupe d'un ovaire adulte. On peut distinguer les différents stades de maturation folliculaire au niveau cortical de cet organe. <http://app-asap.over-blog.com/article-structure-de-l-ovaire-43833787.html>

L'ovaire est divisé en deux zones : une zone corticale, contenant les follicules ovariens et une zone médullaire richement vascularisée (Figure 8). La maturation de l'ovocyte se fait au sein de la structure du follicule ovarien. Au cours de sa maturation, le follicule va grandir pour permettre l'expulsion de l'ovocyte mature.

Durant la maturation folliculaire, certains follicules primordiaux vont maturer en follicules primaires puis secondaires par prolifération des cellules de la granulosa qui vont former plusieurs couches autour de l'ovocyte. La thèque va se mettre en place en périphérie du follicule. On distingue la thèque interne, très vascularisée et qui sera le siège d'une synthèse des stéroïdes ovariens, de la thèque externe qui est un tissu conjonctif. Puis, les cellules de la granulosa vont produire des sécrétions qui vont former une cavité remplie de liquide folliculaire, l'antrum. On parle alors de follicule antral. Enfin, le dernier stade de maturation du follicule précédant l'ovulation est le follicule pré-ovulatoire, ou follicule de De Graaf (Figure 8). Au cours du proœstrus, se déroule la phase folliculaire : les cellules de la granulosa, qui expriment le récepteur à la FSH, vont être stimulées par cette hormone et proliférer, permettant la maturation des follicules et la production d'E2. A l'œstrus, la synthèse importante d'œstradiol par les follicules pré-ovulatoires entraîne un rétrocontrôle positif sur l'hypophyse à l'origine d'un pic de LH qui déclenche l'ovulation. Durant le metœstrus et le dioœstrus, se déroule la phase lutéale, le follicule ovulé se cicatrise pour donner naissance à une structure temporaire : le corps jaune (ou *corpus luteum*) qui va être maintenu par les sécrétions de LH provenant de l'hypophyse. En cas de fécondation de l'ovocyte expulsé, le corps jaune gestatif permet la synthèse de P4, nécessaire au maintien de la gestation. Au cours du développement de l'embryon, le corps jaune dégénère et la synthèse des hormones stéroïdes est assurée par le placenta. En l'absence de fécondation, le corps jaune dégénère et forme une cicatrice dans l'ovaire : le corps blanc (ou *corpus albicans*) et un nouveau cycle peut alors recommencer.

1.2.1.3. Modification structural de l'utérus durant le cycle œstral

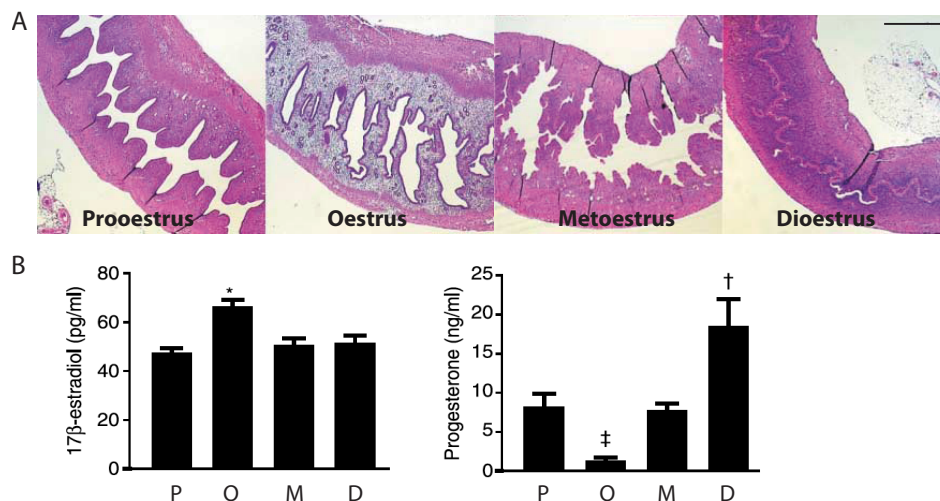
Le proœstrus et l'œstrus sont des phases anaboliques durant lesquelles une croissance active se fait dans les voies génitales en réponses aux hormones ovariennes, alors que le metœstrus se caractérise par une phase catabolique et des changements dégénératifs. Le dioœstrus est une période de quiescence et de croissance lente. Le pic du taux d'E2 circulant qui précède l'ovulation a lieu à l'œstrus, tandis que le niveau de P4 augmente durant le metœstrus et le dioœstrus et diminue du proœstrus à l'œstrus (Figure 9) (Walmer *et al.* 1992, Wood *et al.* 2007).

Au cours des phases de proœstrus et d'œstrus, en réponse aux E2, l'utérus se distend sous l'influence d'une forte activité glandulaire. En proœstrus, les EG prolifèrent et les glandes

deviennent hypertrophiques. Les cellules de l'EL s'allongent et la contractilité musculaire est plus prononcée. Des leucocytes apparaissent dans la muqueuse utérine et des macrophages sont présents dans le stroma sous-jacent à l'EL (dans toutes les autres phases, ils sont présents dans le myomètre et le stroma).

En œstrus, le stroma prolifère, la vascularisation et l'hypertrophie glandulaire sont maximales. On observe une dégradation du collagène de type IV et de laminine de la lame basale des épithéliums.

La phase de métœstrus est une étape de forte activité catabolique. La taille de l'utérus diminue et la vascularisation décroît. La matrice extracellulaire du stroma change et présente une forte diminution de collagène de type I. En parallèle de la chute du taux d'E2 et de P4, l'épithélium perd son organisation et montre une dégénérescence vacuolaire marquée suivie d'un remplacement progressif. On note une augmentation de l'apoptose dans l'épithélium luminal et dans le stroma. Des neutrophiles sont présents dans l'épithélium permettant la phagocytose des débris cellulaires issus de la dégénérescence vacuolaire. En diœstrus, l'utérus se rétrécit encore et devient anémique, la lumière est extrêmement réduite. La motilité musculaire est faible. Les glandes endométriales se replient et deviennent atrophiques (Wood *et al.* 2007).



➤ **Figure 9: Aspect histologique de l'utérus murin et variations hormonales durant le cycle oestral.**

A : Coloration Hematoxyline-Eosine de coupes sagittales d'utérus de souris durant les quatre phases du cycle oestral. Barre d'échelle=500µm. B : Taux d'œstradiol et de progestérone circulant durant les différentes phases du cycle. P : prœstrus, O : œstrus, M : métœstrus, D : diœstrus. D'après (Wood *et al.* 2007).

1.2.2. Rôle de l'utérus : l'implantation embryonnaire

1.2.2.1. Transport des spermatozoïdes

Après avoir traversé le vagin et le cervix, les spermatozoïdes pénètrent dans l'utérus. Leur transport est rendu possible grâce à l'activité contractile du myomètre. L'intensité de ces contractions augmente au cours de la phase folliculaire pour atteindre un pic lors de l'ovulation avec des contractions de basses fréquences et de hautes amplitudes. Ce sont les hormones ovariennes qui régulent ce mécanisme : la P4 inhibe et les E2 stimulent l'activité musculaire utérine. Des études chez la truie, ont montré que les E2 augmentent les jonctions « gap » entre les cellules du myomètre, le taux de myosine contenu dans les CML et ainsi l'activité contractile de ces cellules (Langendijk *et al.* 2005). Les hormones hypophysaires entrent également en jeu par le biais de l'ocytocine et de la LH. Associée aux E2, l'ocytocine induit la production de prostaglandines E2 dans l'utérus qui agit ainsi directement sur la contraction myométriale (Langendijk *et al.* 2005). De plus, les hormones contenues dans le liquide séminal déversé par le mâle amplifient également ce phénomène. En effet, le liquide séminal contient aussi des E2, de l'ocytocine et des prostaglandines (Katila 2001). Les spermatozoïdes atteignent ainsi rapidement l'entrée des oviductes où la fécondation de l'ovocyte va avoir lieu. Dans l'oviducte, l'œuf fécondé va ensuite par des événements de divisions successives, et de différenciation cellulaire former le blastocyste au 4^{ème} jour de gestation (E4). Le blastocyste mature est composé de trois types cellulaires : l'épithélium externe ou trophoctoderme, l'endoderme primitif et la masse de cellules internes pluripotentes. Les cellules de la masse interne seront à l'origine de l'embryon et le trophoctoderme fera la première connexion physique et physiologique avec l'épithélium utérin maternel. Arrivé à maturité, le blastocyste part de l'oviducte pour aller s'implanter dans l'utérus (Wang *et al.* 2006).

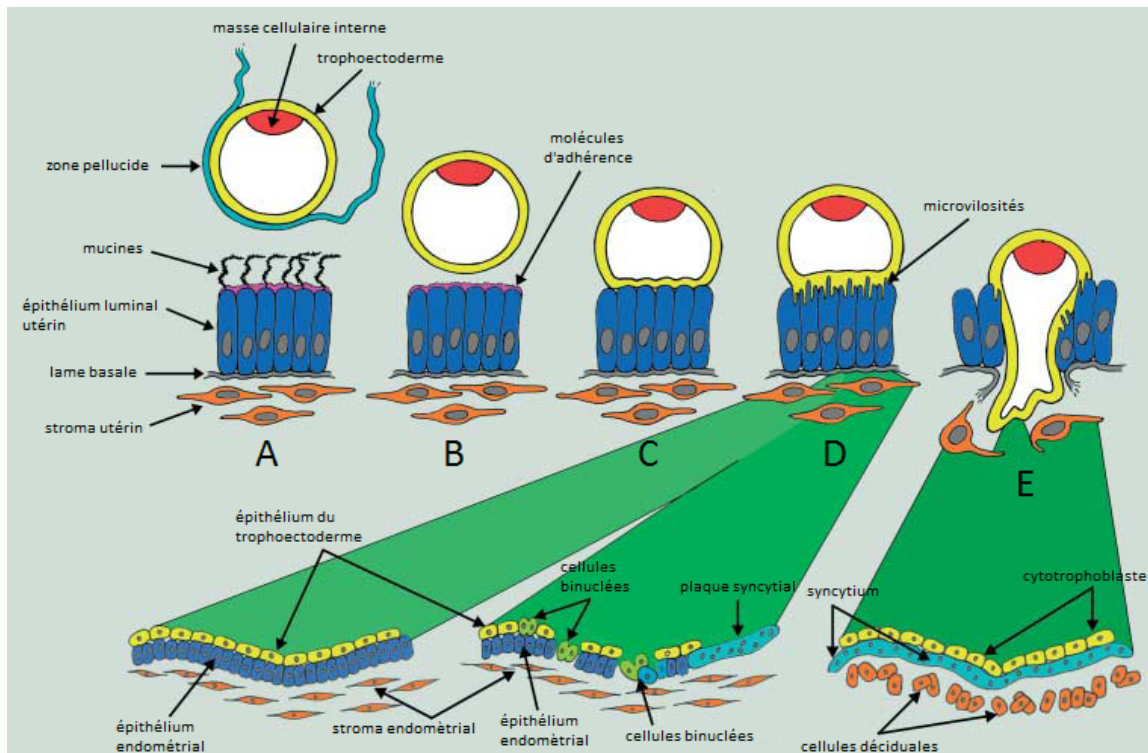
1.2.2.2. L'implantation embryonnaire

1.2.2.2.1. Les différentes étapes de l'implantation embryonnaire

L'implantation a lieu chez la souris à E4, lorsque les cellules du trophoctoderme entrent en contact avec l'épithélium utérin. L'implantation se déroule en trois phases successives : l'apposition, l'adhérence et enfin, l'invasion (Figure 10). Cette séquence d'événements,

orchestrée par les stéroïdes ovariens, dure environ 24 heures chez la souris. Le processus d'implantation nécessite une modification profonde des deux tissus. Une synchronie précise se met en place entre la maturation de l'embryon et celle du tissu maternel. Pour cela, le blastocyste perd tout d'abord la zone pellucide qui le recouvre par protéolyse. Par ailleurs, les cellules du trophoctoderme acquièrent des propriétés de cellules invasives (trophoblaste) (Figure 10). Simultanément, l'utérus doit être en phase de réceptivité : les cellules épithéliales perdent leurs microvillosités et l'expression de mucines (muc-1) au pôle apical, marqueur de polarité, disparaît. La composition des membranes apicales et basales devient similaire (Bazer *et al.* 2009).

A l'apposition, le blastocyste établit un premier contact avec la surface du tissu maternel. Cette étape est facilitée par la fermeture de la lumière de l'utérus qui se fait sous l'influence de la P4. Le contact se fait au pôle anti-mésométrial des cornes utérines (face ventrale de la souris). La voie de signalisation d'HB-EGF, localement induite par le blastocyste sur l'EL, est essentielle à cette phase (Hamatani *et al.* 2004). Durant la phase d'adhérence, des systèmes d'adhésion entrent en jeu à E5.5 ancrant l'embryon à la paroi utérine. L'association entre le trophoctoderme et l'épithélium devient plus stable. Les molécules d'adhésion les plus importantes dans ce processus sont les intégrines, les selectines, les galectines, les protéoglycans héparanes-sulfates, les cadhérines et les complexes trophinine-tastine-bystine (Carson *et al.* 2000, Dey *et al.* 2004, Wang *et al.* 2006). Durant la phase d'invasion, les cellules de l'épithélium utérin meurent par apoptose, la lame basale est détruite, et les cellules du trophoblaste pénètrent le tissu maternel. Dans le processus d'invasion, l'action des prostaglandines est essentielle (Wang *et al.* 2006). A ce stade, les cellules du stroma, adjacentes au site d'implantation, prolifèrent et se différencient, constituant une nouvelle structure appelée décidua. Durant la décidualisation, les cellules stromales se divisent, deviennent polyploïdes, gonflent, acquièrent du glycogène et s'entourent d'une nouvelle matrice extracellulaire par une surexpression de fibronectines et de laminines (Abrahamsohn *et al.* 1993). Elles expriment de nouvelles protéines : la prolactine, l' α -actine et l'IGFBP-1 (Insuline-like Growth Factor Binding Protein 1) et de la phosphatase alcaline (King *et al.* 2000, Thibault *et al.* 2001). Les cellules déciduales (CD) constituent une importante source de facteurs nutritifs essentiels au développement embryonnaire, mais également de facteurs de croissance et de cytokines leur permettant de jouer un rôle d'immunorégulateurs au cours de l'invasion du blastocyste pour la protection de la mère contre la nature invasive de l'embryon (Thibault *et al.* 2001, Bazer *et al.* 2009).



➤ **Figure 10: Implantation embryonnaire dans l'utérus chez la souris**

A) Perte de la zone pellucide. B) Protéolyse des mucines exprimées au pôle apical des CE de l'endomètre. C) Apposition de l'embryon sur l'EL de l'endomètre. D) Acquisition de microvillosités à la surface des CE. E) Décidualisation des CS et pénétration de l'embryon dans l'endomètre. Adapté de (Bazer *et al.* 2009).

A E5.5, lorsque l'implantation est achevée, l'embryon a établi un système provisoire d'échanges avec la circulation maternelle composée de trois éléments : l'endoderme pariétal, la membrane de Reichert (une membrane basale extracellulaire sécrétée par les cellules pariétales), et le trophoblaste. Ce système d'échange fonctionne jusqu'à la fin de la période de gastrulation à E8, lorsque les circulations maternelle et fœtale sont connectées et que le placenta définitif est formé. Jusqu'à E10.5 (correspondant à la fin de la période invasive) les CD entrent soit en apoptose, soit dans une nouvelle phase de différenciation conduisant à la formation de cellules de la décidue basale ou caduque basale (King *et al.* 2000).

1.2.2.2.2. Régulation de l'implantation

Les stéroïdes ovariens orchestrent les modifications utérines permettant l'implantation via leurs récepteurs nucléaires et leur différents isoformes ER (ER α et ER β) et PR (PRA et PRB). Les E2 *via* ER α activent la prolifération cellulaire tandis que la P4 induit la différenciation des CS *via* PRA durant les trois jours qui succèdent l'attachement de l'embryon à l'EL (soit

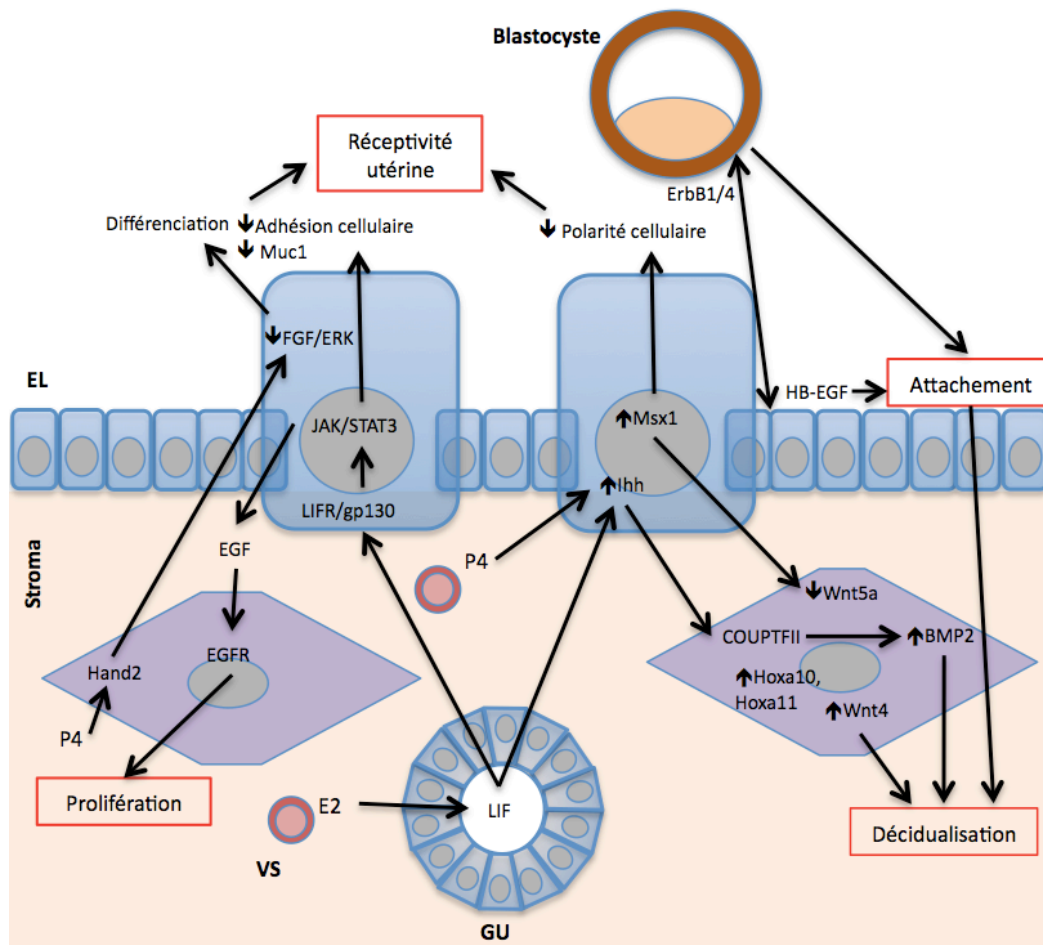
de E4.5 à environ E8) (Paria *et al.* 1999, Mulac-Jericevic *et al.* 2000, Thibault *et al.* 2001, Ramathal *et al.* 2010).

Les E2 vont activer un certain nombre de gènes cibles durant l'implantation dont le LIF. Le LIF joue un rôle déterminant dans la phase préimplantatoire puisque sa présence permet les mécanismes de décidualisation, d'attachement et de migration de l'embryon dans l'utérus (Stewart *et al.* 1992, Wang *et al.* 2006). Il est exprimé chez la souris dans l'épithélium glandulaire à E3 et dans le stroma à E4. Le LIF produit par les GU se lie à son récepteur LIFR et son corécepteur gp130 va activer Stat3 dans l'épithélium luminal. Il régule ainsi la transition entre prolifération et différenciation de l'EL. Dans le stroma, le LIF régule la prolifération par la régulation du signal à l'EGF (epidermal growth factor) et la décidualisation en contrôlant des gènes régulés par la P4, comme Indian hedgehog (Ihh) notamment (Figure 11) (Hantak *et al.* 2014).

En effet, certains signaux issus de morphogènes comme hedgehog (HH), Wnt et les BMP (bone-morphogenetic-proteine) jouent aussi un rôle important dans l'implantation. Ihh, produit par l'EL sous l'influence de la P4 active le facteur de transcription COUP-TFII (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II) présent dans les cellules stromales et permet de manière indirecte la réceptivité utérine par les signaux envoyés du stroma à l'épithélium. Ihh est également important pour la décidualisation car il permet via COUPTFII l'induction de *Bmp2* qui est exprimé dans le stroma dès l'adhésion du blastocyste et permet la décidualisation (Paria *et al.* 2001). *Wnt4*, aussi exprimé dans le stroma durant la même période, permet également la décidualisation des cellules stromales en régulant leur différenciation et leur survie par la régulation de l'action de la P4 (Franco *et al.* 2011).

L'expression d'un certain nombre de gènes essentiels à la maturation post-natale joue donc aussi un rôle important dans l'implantation. C'est le cas de certains gènes homéotiques comme les gènes *Hoxa10* et *Hoxa11*. Ces gènes sont exprimés fortement par le stroma utérin durant la phase réceptive et cette expression persiste durant la décidualisation (Benson *et al.* 1996). L'inactivation de *Hoxa10* et *Hoxa11* chez la souris provoque une infertilité due à un défaut de décidualisation et de prolifération stromale, indiquant qu'il sont essentiels à ces processus (Lim *et al.* 1999). D'autres gènes homéotiques, *Msx1* et *Msx2* (msh homeobox), sont aussi essentiels car ils permettent le changement de la polarité dans l'EL nécessaire à l'invasion en inhibant l'expression de *Wnt5a*, qui module les complexes E-cadhérine- β -

caténine qui établissent la polarité apico-basale (Daikoku *et al.* 2011). L'ensemble de ces mécanismes moléculaires est résumé Figure 11.



➤ **Figure 11: Dynamique de l'implantation chez la souris**

L'utérus devient réceptif à l'implantation par l'intermédiaire de différents signaux moléculaires. Le LIF sécrété par les glandes utérines (GU), sous l'influence des E2, va se lier à ses récepteurs LIFR/gp130 sur les cellules de l'épithélium luminal (EL) et activer Stat3, qui va permettre la diminution de l'expression des mucines 1 (Muc1) au site d'implantation. L'activation de la voie JAK/STAT va aussi stimuler la production d'EGF par l'EL et permettre la prolifération des cellules stromales. Hand2 dont l'expression est stimulée par la P4 dans les cellules stromales, va inhiber l'activation de la voie de signalisation FGF/ERK ce qui va diminuer la prolifération et induire la différenciation de l'EL. Dans l'EL, l'augmentation de l'expression de Msx1 agit sur l'expression de Wnt5a stromale ce qui va diminuer les complexes β -caténine-E-cadhérines et diminuer la polarité cellulaire de l'EL. Le LIF et la P4 vont stimuler la production d'Ihh dans l'EL qui va agir sur les cellules stromales en stimulant COUPTFII qui va augmenter l'expression de BMP2 qui agit sur la décidualisation des cellules stromales. L'expression dans les cellules stromales de Wnt4, Hoxa10 et Hoxa11, est aussi essentielle pour la décidualisation. L'interaction HB-EGF et ErbB1/4 va permettre l'attachement du blastocyste à l'EL. VS : Vaisseaux sanguins. Adapté de (Hantak et al. 2014) et (Cha et al. 2012)

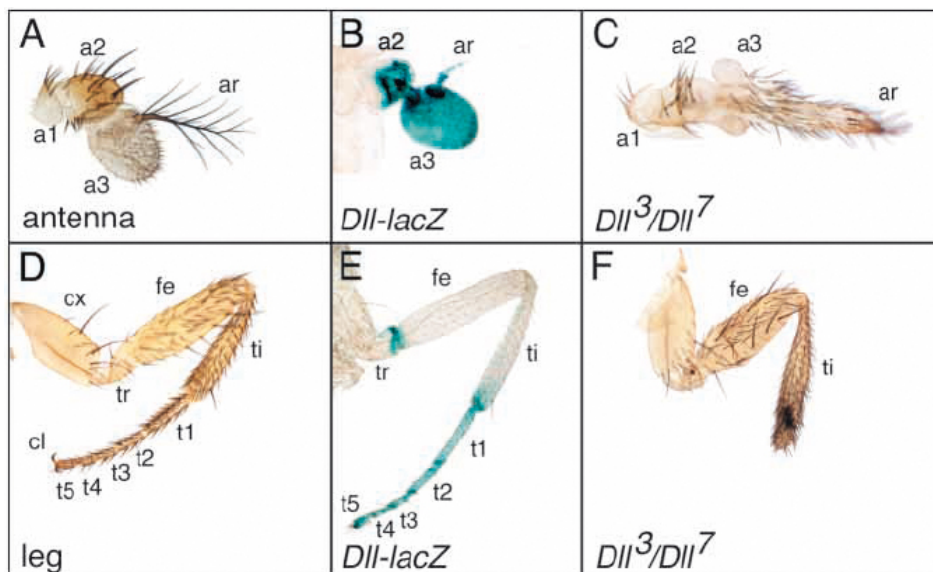
2. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DLX5, DLX6 ET FOXL2 : IMPLICATIONS DANS LA REPRODUCTION

2.1. Les gènes *Dlx5* et *Dlx6*

2.1.1. Les gènes *Dlx*

Un gène homéotique est un gène dont la mutation conduit à l'apparition d'un organe bien formé, mais à un mauvais emplacement du corps (appelé homéose). Les premières descriptions de phénotypes homéotiques remontent à 1894 par William Bateson, qui observa l'apparition de pattes à la place des antennes chez la drosophile. Bateson comprit qu'au cours du développement, un « choix » a lieu, donnant l'identité propre d'un segment de l'organisme. Lorsque ce choix est faux, le segment perd son identité et ne possède pas les appendices ou organes attendus. On apprendra plus tard que ce sont des gènes qui déterminent ces choix.

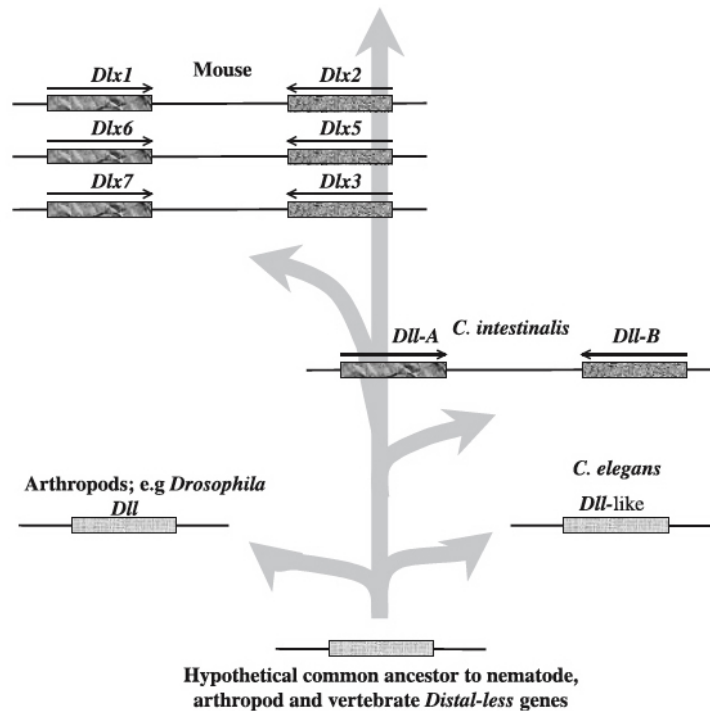
Les gènes *Dlx* codent pour des facteurs de transcription à homéodomaine apparentés au gène *distal-less (Dll)* de Drosophile (Cohen *et al.* 1989 , Porteus *et al.* 1991). Ces gènes ont été identifiés dans de nombreux groupes de Bilatériens (Holland *et al.* 1996, Caracciolo *et al.* 2000, Myojin *et al.* 2001, Neidert *et al.* 2001). Les gènes *Dlx* sont impliqués dans de nombreux processus développementaux, notamment dans la morphogenèse des appendices, le développement du cerveau antérieur et des structures cranio-faciales telles que les arcs pharyngés et des organes sensoriels (revue dans (Panganiban *et al.* 2002)). Chez la drosophile, le gène *Dll* est exprimé dans le primordium des pattes et des différents appendices antérieurs (Figure 12) (Cohen *et al.* 1989, Panganiban *et al.* 2002). L'inactivation totale de *Dll* conduit à une létalité embryonnaire avant le premier stade larvaire (Cohen *et al.* 1989). L'analyse de mutants hypomorphes, présentant une réduction de l'activité de *Dll*, a permis de montrer son rôle dans la mise en place de l'axe proximo-distal (P/D), des appendices tel que les pattes, les antennes, les pièces buccales ou encore la plaque anale (Cohen *et al.* 1989, Gorfinkiel *et al.* 1999).



➤ **Figure 12 : Profil d'expression du gène *Distal-less* (*dll*) chez la *Drosophile***

L'utilisation d'un gène rapporteur (*lacZ*) codant pour la β -galactosidase permet de visualiser le profil d'expression du gène *Dll* chez la drosophile adulte. Photos représentant une antenne (A-C) ou une patte (D-F). Ce gène est exprimé dans la partie distale des appendices (antennes (B), pattes (E), etc.). *Dll*³ et *Dll*⁷ sont deux allèles hypomorphes (Panganiban et al. 2002).

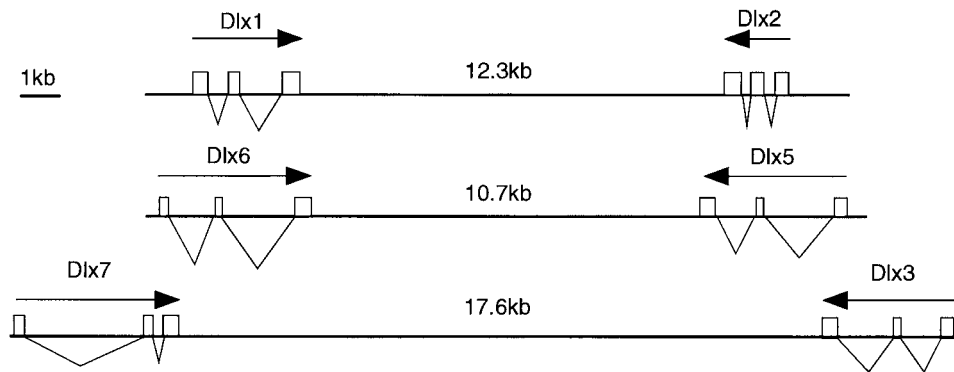
Les gènes *Dlx* (*Distal-less related homeobox gene*) ont, par la suite, été identifiés dans de nombreuses espèces, notamment chez tous les chordés (Dolle et al. 1992, Schummer et al. 1992, Holland et al. 1996, Caracciolo et al. 2000, Myojin et al. 2001, Neidert et al. 2001). Le modèle actuel propose que le gène ancestral *Dll* ait subi une duplication en *cis* aboutissant à l'apparition de deux gènes *Dll-A* et *Dll-B* en « tandem inverse » chez les urochordés (par exemple *Ciona intestinalis*) (Figure 13). Une série d'évènements de duplication a conduit à la formation d'au moins trois paires de gènes *Dlx* chez les vertébrés. Chacune de ces paires est liée à un cluster de gènes *Hox*. L'hypothèse actuelle est en faveur d'une co-évolution des gènes *Hox* et *Dlx* par les mêmes événements de duplication (Stock et al. 1996, Zerucha et al. 2000, Sumiyama et al. 2003).



➤ **Figure 13 : Modèle de l'évolution des gènes Dlx**

Ce modèle présente l'évolution des gènes *Dlx* à partir d'un hypothétique gène ancestral. Une duplication en cis aurait abouti à l'apparition des gènes *Dll-A* et *Dll-B* qui par une succession de duplication en trans aurait conduit à l'apparition de trois paires de gènes *Dlx* chez les Vertébrés (Zerucha et al. 2000).

Les génomes de mammifères contiennent six gènes *Dlx* qui sont répartis en trois clusters bigéniques : *Dlx1-2*, *Dlx5-6* et *Dlx3-4* respectivement sur les chromosomes 2, 7, 17 chez l'Homme et 2, 6, 11 chez la souris (Selski et al. 1993, Robinson et al. 1994, Simeone et al. 1994, Nakamura et al. 1996). L'organisation génomique de ces clusters est sensiblement identique. Les deux gènes d'un même cluster sont organisés en tandem inverse et comportent chacun trois exons avec une région intergénique de taille variable (Figure 14).

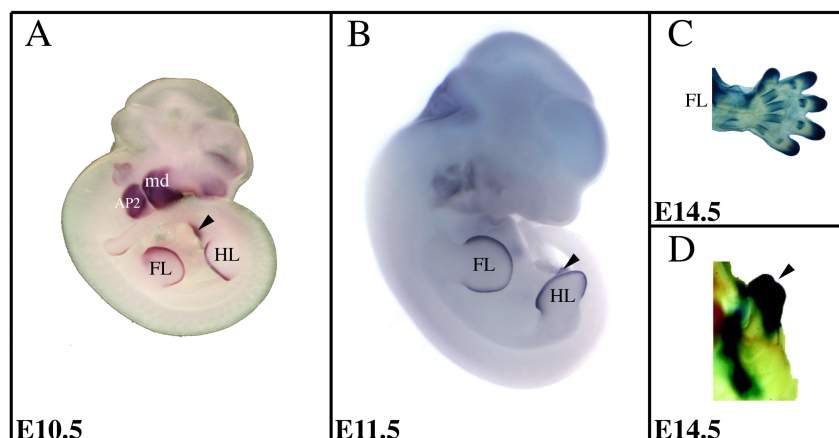


➤ **Figure 14 : Représentation schématique de l'organisation génomique des gènes DLX humains**

Les exons sont représentés par les rectangles vides et la taille de la région intergénique correspond à la distance entre les deux codons stop. Référence des séquences génomique : AC0223925 pour DLX1-2, AC004774 pour DLX5-6 et IC452638 pour DLX3-4(7) (Sumiyama *et al.* 2003).

Dans notre laboratoire, nos études se focalisent sur un couple de gènes *Dlx* : les gènes *Dlx5* et *Dlx6*. Ces deux gènes sont impliqués dans de nombreux processus développementaux chez les vertébrés. Ainsi, on retrouve leur expression dans des structures cranio-faciales (telles que le cerveau antérieur, les dérivés des cellules de la crête neurale céphalique ou les organes sensoriels) et dans les différents appendices de l'embryon en développement (les membres, le tubercule génital) (Figure 15) (Simeone *et al.* 1994, Acampora *et al.* 1999, Beverdam *et al.* 2002, Depew *et al.* 2002, Robledo *et al.* 2002). Le profil d'expression des gènes *Dlx* est comparable à celui du gène *Dll* chez la drosophile (pièces buccales, pattes et plaque anale) indiquant une certaine conservation de la fonction des gènes *Dlx* dans la morphogenèse au cours de l'évolution.

Chez l'adulte, l'expression de ces gènes est maintenue dans certains tissus tels que le cerveau (Stuhmer *et al.* 2002), l'os (Samee *et al.* 2008) ou encore les gonades femelles (Bouhali *et al.* 2011).



➤ **Figure 15 : Profil d'expression des gènes *Dlx5* chez l'embryon de souris**

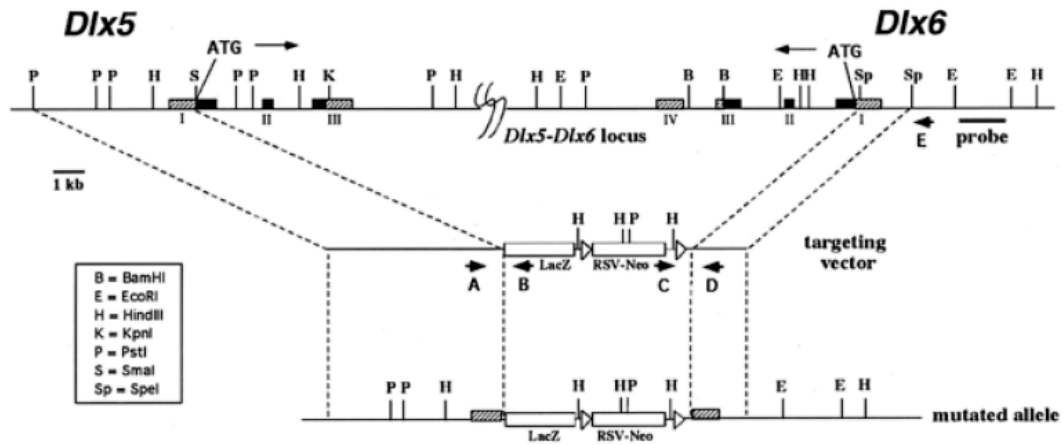
A-B. Hybridation *in situ* *Dlx5* *in toto* chez des embryons sauvages à E10.5 (A) et E11.5 (B). C-D. Coloration X-gal sur des embryons *Dlx5^{lacZ}* à E14.5. *Dlx5* est exprimé au niveau des structures cranio-faciales (arc mandibulaire (md) et 2^{ème} arc pharyngien (AP2)), de la crête apicale ectodermique des bourgeons de membres antérieurs (FL) et postérieurs (HL) ainsi qu'au niveau du tubercule génital (tête de flèche) (Merlo *et al.* 2000).

2.1.2. Rôle de *Dlx5/6* chez la souris

2.1.2.1. Inactivation des gènes *Dlx5* et *Dlx6* chez la souris

Des modèles murins d'inactivation d'un ou de plusieurs gènes *Dlx* ont été réalisés pour étudier leurs fonctions (Qiu *et al.* 1995, Qiu *et al.* 1997, Acampora *et al.* 1999, Beverdam *et al.* 2002, Depew *et al.* 2002, Merlo *et al.* 2002, Depew *et al.* 2005). Ces études ont montré que l'inactivation d'un seul gène *Dlx* présente un phénotype moindre en comparaison avec la double inactivation de *Dlx* du même cluster. Cela indique une redondance fonctionnelle entre ces gènes, mais également des rôles propres à chaque *Dlx*.

L'inactivation des gènes *Dlx5* et *Dlx6*, chez la souris, a été générée en 2002, entre autres, au sein de notre laboratoire (Beverdam *et al.* 2002, Depew *et al.* 2002, Merlo *et al.* 2002). Ces souris ont été obtenues par recombinaison homologue ciblée, par insertion d'une construction présentant une délétion comprise entre l'exon 1 de *Dlx5* et l'exon 1 de *Dlx6* (Figure 16).

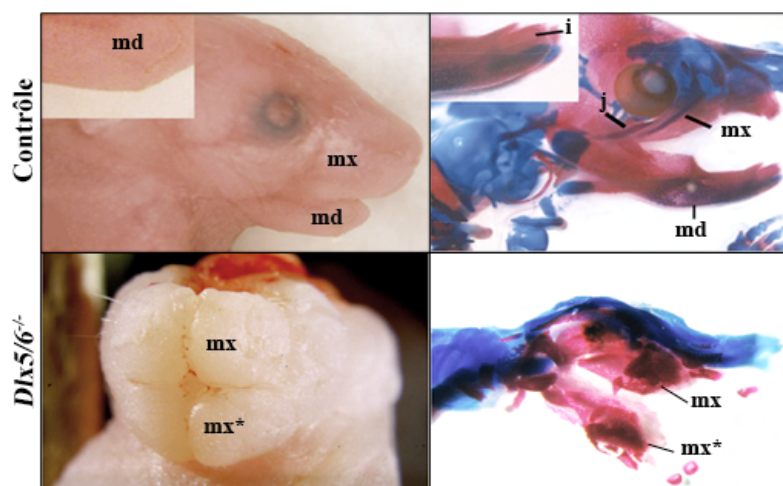


➤ **Figure 16 : Construction utilisée pour la génération du double mutant *Dlx5;Dlx6***

Une région de 17kb comprise entre les exons 1 de *Dlx5* et *Dlx6* a été remplacée par une cassette *lacZ* (Merlo *et al.* 2002).

L'analyse des mutants a montré l'implication de ces gènes dans le développement embryonnaire. La double inactivation homozygote de *Dlx5* et *Dlx6* conduit à une létalité périnatale et à des graves malformations cranio-faciales. Dans la majorité des cas, les nouveau-nés *Dlx5/6*^{-/-} présentent une exencéphalie. Les structures les plus atteintes sont les dérivés du bourgeon mandibulaire (mâchoire inférieure) qui présentent une forme et une taille similaire aux dérivés maxillaires (mâchoire supérieure) (Figure 17) (Beverdam *et al.* 2002, Depew *et al.* 2002). Cette transformation conduit à la formation d'une bouche symétrique. Ainsi, en l'absence de *Dlx5* et *Dlx6*, on observe une transformation homéotique de la mâchoire inférieure.

Ce phénotype est dû à la perte d'expression des gènes *Dlx5* et *Dlx6* dans les cellules de la crête neurale céphalique, provoquant une perte de leur identité et une incapacité à former les os et le cartilage du squelette crânien. Ce défaut entraîne à son tour une absence de formation de muscles cranio-faciaux (Beverdam *et al.* 2002, Heude *et al.* 2010). Ces données montrent que ces gènes sont requis pour donner l'identité mandibulaire aux dérivés cranio-faciaux.

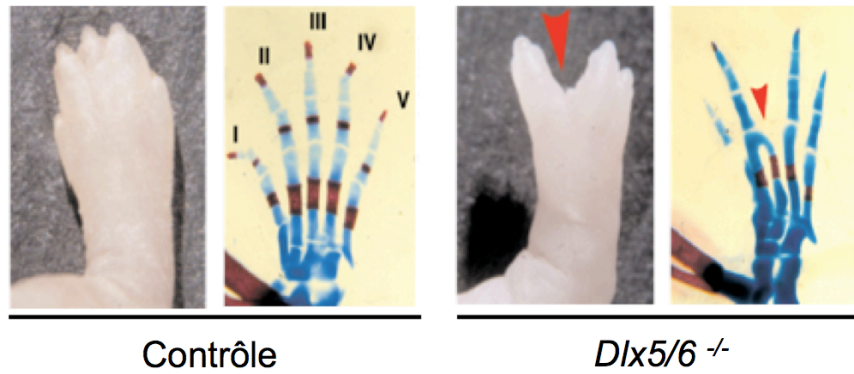


➤ **Figure 17 : Phénotype « cranio-facial » des embryons de souris $Dlx5/6^{-/-}$**

Vue externe et préparation squelettique d'embryons contrôles et mutants ($Dlx5/6^{-/-}$) à E18.5. On observe une transformation (mx^) de la mâchoire inférieure (md) en mâchoire supérieure (mx) résultant en une mâchoire symétrique (modifiée d'après (Beverdam et al. 2002)).*

Par ailleurs, les embryons $Dlx5/6^{-/-}$ présentent une ectrodactylie des pattes postérieures (absence d'un ou plusieurs doigts) (Figure 18). Les préparations squelettiques d'embryons à E14.5 et E18.5 montrent des défauts de la partie distale de membres caractérisés par des doigts plus courts ou absents souvent accompagnés par une syndactylie des doigts restants (fusion plus ou moins complète de deux ou plusieurs doigts) (Merlo *et al.* 2002). Les gènes $Dlx5$ et $Dlx6$ ont été considérés comme des candidats pour la maladie humaine rare dite ectrodactylie non syndromique ou malformation des « pieds et mains fendus » de type 1 (Split Hand/Foot Malformation type 1, SHFM1, OMIM # 183600) car ils sont contenus dans la région génomique minimale liée à cette ectrodactylie en 7q21.3 (Scherer *et al.* 1994, Crackower *et al.* 1996).

D'autre part, les patients atteints de SHFM1 sont souvent également atteints d'un retard mental et/ou de défauts cranio-faciaux et certains hommes présentent également des défauts de masculinisation tels qu'un hypospadias, un micro-penis ou des testicules atrophiques (Giltay *et al.* 2002, Garcia-Ortiz *et al.* 2005, Suzuki *et al.* 2008).



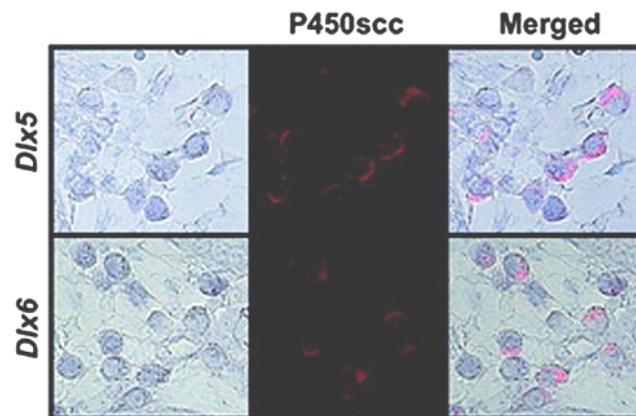
➤ **Figure 18 : Phénotype « pattes fendues » des embryons de souris *Dlx5/6*^{-/-}**

*Vue externe et préparation squelettique d'embryons contrôles et mutants (*Dlx5/6*^{-/-}) à E18.5 (Merlo et al. 2002)*

2.1.2.2. Rôle des gènes *Dlx5* et *Dlx6* dans la reproduction

2.1.2.2.1. Dans le testicule

L'étude de Nishida et coll. en 2008 a présenté le rôle des gènes *Dlx5* et *Dlx6* dans la fonction reproductive masculine (Nishida et al. 2008). *Dlx5* et *Dlx6* sont exprimés dans les testicules par les cellules de Leydig, responsables de la stéroïdogénèse testiculaire (Figure 19).



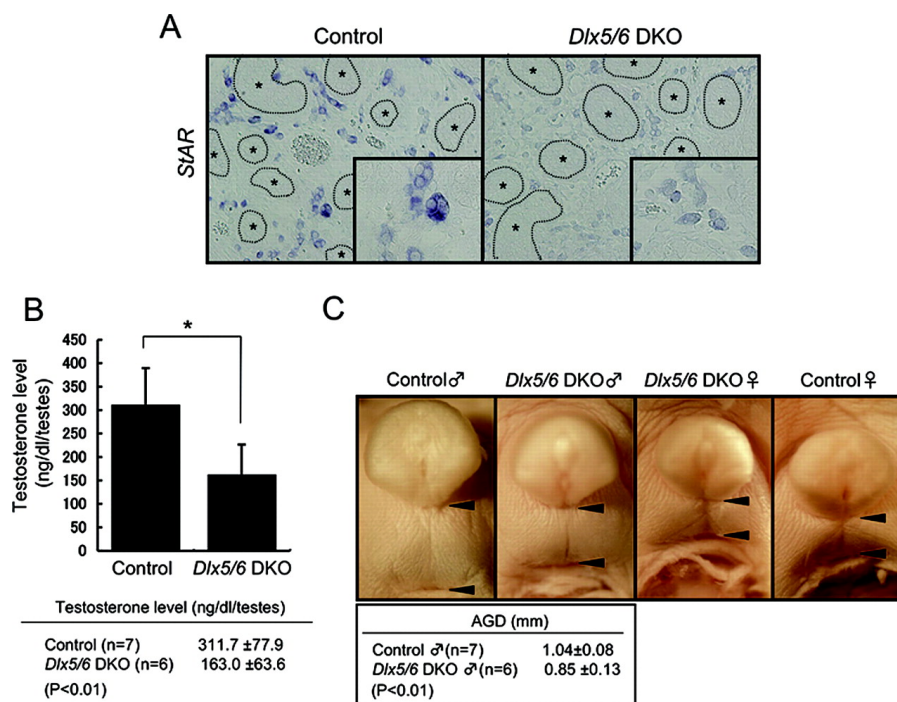
➤ **Figure 19 : Expression de *Dlx5* et *Dlx6* dans les cellules de Leydig chez la souris**

*Hybridation in situ montrant l'expression des gènes *Dlx5* et *Dlx6* dans la région interstitielle de testicules embryonnaire de souris à E16.5. Les cellules marquées présentent les caractéristiques morphologiques des cellules de Leydig et co-expriment *P450scc*, un marqueur spécifique des cellules de Leydig (Nishida et al. 2008).*

Ces données ont permis de montrer que *Dlx5* et *Dlx6* avaient un rôle dans la différenciation testiculaire et la stéroïdogénèse. Ce rôle a été confirmé par l'étude de l'action de *Dlx5* sur

l'expression du gène *StAR* (Steroidogenic Acute Regulatory gene). *StAR* est un gène essentiel à la stéroïdogénèse qui code pour un transporteur permettant l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie, étape limitante dans la synthèse des hormones stéroïdiennes. Une étude *in vitro* sur des cellules de Leydig en culture a montré que *Dlx5* active indirectement l'expression de *StAR* par *GATA-4* (Nishida *et al.* 2008).

In vivo, l'analyse de l'inactivation de *Dlx5* et *Dlx6* a permis de confirmer leur rôle dans le contrôle de la stéroïdogénèse. En effet, le double mutant *Dlx5/6*^{-/-} présente des défauts de masculinisation caractérisés par une réduction de l'ordre de 50% du taux de testostérone testiculaire, une réduction de la distance ano-génitale, une diminution de l'expression de *StAR* au niveau des testicules fœtaux (Figure 20) (Nishida *et al.* 2008).



➤ **Figure 20 : Phénotype « testiculaire » des embryons de souris *Dlx5/6*^{-/-}**

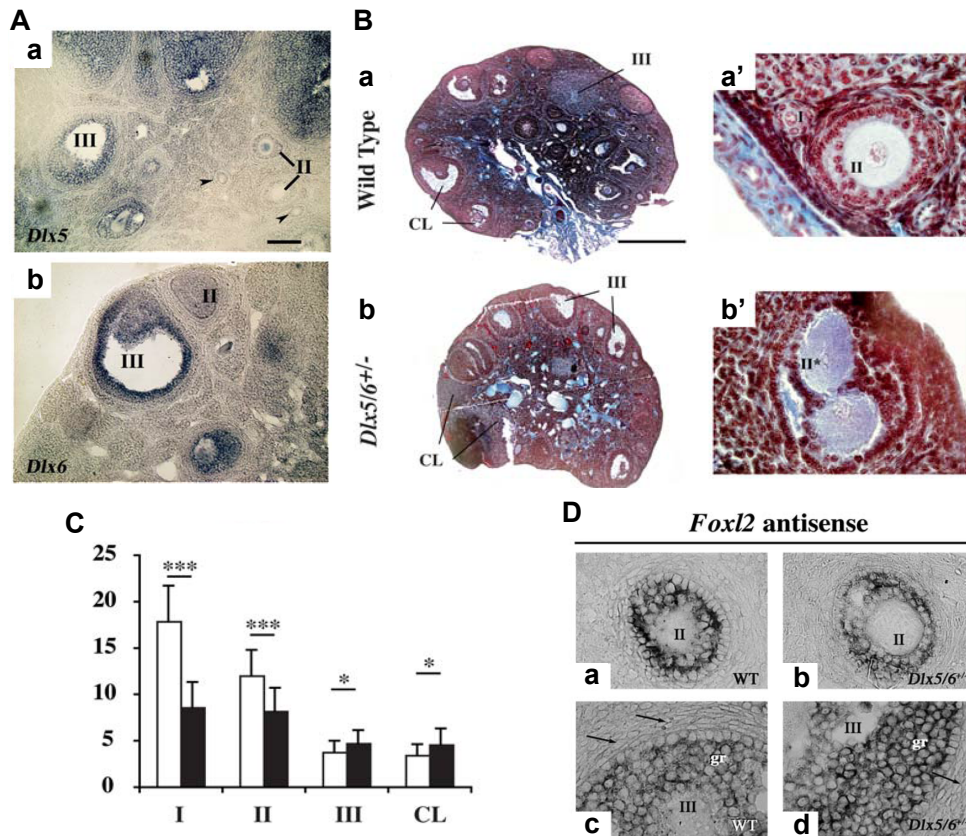
A. Expression de *StAR* détectée par hybridation *in situ*. On peut observer une réduction importante du niveau d'expression de ce gène en contexte double mutant pour *Dlx5* et *Dlx6* (*Dlx5/6* DKO). Les étoiles (*, panneau A) représentent les cordons séminifères. B. Mesure du taux de testostérone testiculaire. Test statistique de Student *, $p < 0,01$. C. Mesure de la distance ano-génitale (AGD) (entre les deux têtes de flèche) d'embryons à E18.5 (Nishida *et al.* 2008).

Ainsi, cette étude a permis de montrer que les gènes *Dlx* peuvent contrôler la fonction de reproduction chez les mammifères.

2.1.2.2.2. Dans l'ovaire

Dans une étude du laboratoire, Bouhali et coll. en 2011 ont montré que ces gènes jouaient aussi un rôle dans la reproduction féminine. En effet, la réduction allélique de ces gènes chez les femelles *Dlx5/6*^{+/-} conduit à une diminution de fertilité associée à un défaut de maturation des follicules ovariens. Ce défaut conduit à un épuisement précoce du pool folliculaire reproduisant une pathologie humaine qui est l'insuffisance ovarienne prématurée (IOP). Cette pathologie est caractérisée par un arrêt prématuré de la fonction ovarienne (OMIM #311360, #300511, #300604, #608996, #611548, #612310, #612964). Elle est définie cliniquement par une aménorrhée de plus de quatre mois avant l'âge de 40 ans, accompagnée d'une élévation des taux circulants de FSH (Goswami *et al.* 2005, Christin-Maitre *et al.* 2008). La prévalence de cette maladie est de 1% chez les femmes de moins de 40 ans et de 1/1000 chez les femmes de moins de 30 ans. Cette prévalence est estimée entre 1 et 3% de la population (Aiman *et al.* 1985). Même si la majorité des cas d'IOP sont idiopathiques (Goswami *et al.* 2005), plusieurs étiologies ont déjà été décrites. Les causes principales peuvent être (i) auto-immunes, (ii) iatrogènes, (iii) virales ou (iv) génétiques (Christin-Maitre *et al.* 2006, Bachelot *et al.* 2009).

Dans cette étude, Bouhali et coll. ont pu mettre en évidence la régulation croisée entre *Dlx5* et *Foxl2* : un gène majeur dans la fonction ovarienne et dont les mutations chez la femme sont associés à l'IOP (Figure 21) (Bouhali *et al.* 2011). En effet, il avait déjà été montré que chez les mutant *Dlx5/6* durant l'embryogénèse, il y avait une augmentation de l'expression de *Foxl2* dans la région des arc branchiaux où *Dlx5/6* s'expriment normalement, indiquant que *Dlx5* et *Dlx6* inhibait *Foxl2* durant l'embryogénèse (Jeong *et al.* 2008). Ici, l'équipe a pu montrer que c'était aussi le cas dans l'ovaire. Les expériences *in vitro* sur une lignée de cellules de granulosa humaine KGN, ont montré que *Dlx5* inhibait l'expression de *Foxl2* et que *Foxl2* activait l'expression de *Dlx5*. Chez les femelles *Dlx5/6*^{+/-}, l'hybridation *in situ* révélant les transcrits de *Foxl2*, a mis en évidence une expression augmentée de *Foxl2* dans les follicules à antrum comparée aux contrôles soulignant une diminution de l'inhibition de *Foxl2* par *Dlx5/6* (Figure 21). Il existe donc une régulation mutuelle de ces gènes orchestrant la maturation folliculaire ovarienne.



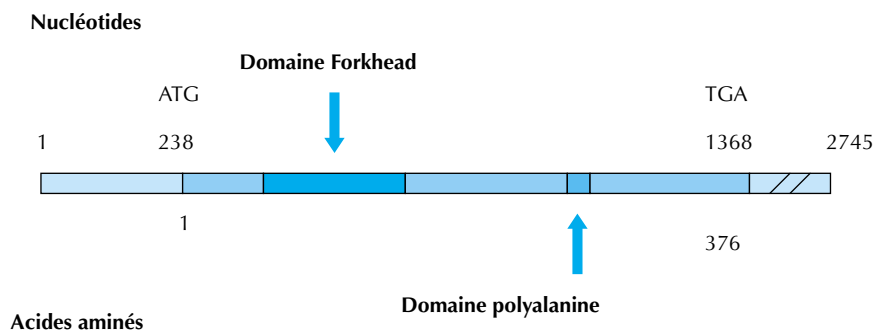
➤ **Figure 21. Phénotype ovarien des souris *Dlx5/6*^{+/-}**

A. Hybridation in situ montrant la présence des ARNm de *Dlx5* (a) et *Dlx6* (b) dans les cellules de la granulosa des follicules à antrum. B, C. Phénotype ovarien des *Dlx5/6*^{+/-}. On note la présence de follicules anormaux (B b'), la diminution de follicules de stade précoce et l'augmentation de follicules tardifs et de corps jaune chez les mutant (C, colonnes noires) comparé au contrôle (C, colonne blanche). D. Une plus forte expression de *Foxl2* dans les stades follicule tertiaire (III) est observé dans les ovaires *Dlx5/6*^{+/-} comparés au contrôle. I : follicule primaire, II : follicule secondaire, III : follicule tertiaire, CL : corpus luteum. D'après (Bouhali et al. 2011).

2.2. Le gène *Foxl2*

2.2.1. Profil d'expression de *Foxl2*

Foxl2 est un gène monoexonique de 2,7kb. Il code pour un facteur de transcription de 376 acides aminés contenant un domaine de liaison à l'ADN forkhead, deux séquences de localisation nucléaire (ou NLS, Nuclear Localisation Signal) et un domaine polyalanine constitué d'une répétition homogène de quatorze résidus alanines chez les mammifères (Beysen *et al.* 2008, Moumne *et al.* 2008).



➤ **Figure 22 : Structure du gène *Foxl2***

*Représentation schématique de l'exon du gène *Foxl2*. Les nombres au dessus correspondent aux nucléotides, ceux en dessous aux acides aminés.*

L'analyse des séquences protéiques réalisée chez différents mammifères, chez le poulet et certains poissons montre que ce gène est très conservé entre les espèces (Figure 23) (Cocquet *et al.* 2002, Cocquet *et al.* 2003, Govoroun *et al.* 2004, Wang *et al.* 2004, Baron *et al.* 2005). Le domaine forkhead présente un haut degré de conservation (Figure 23, en bleu). En effet, seuls trois acides aminés de ce domaine ne sont pas conservés entre l'Homme, la chèvre, la souris et le fugu (Cocquet *et al.* 2002).

```

Homme      MMASYPEPEDAAGALLAPETGRTVKEPEGP-PPSPGKGGGGGGTAPEKDPDAQKPPYSY
Chèvre    MMASYPEPEDASGALLAPETGRAAKEPEAPAPSPGKGGGGGAGAAPEKDPDAQKPPYSY
Souris    MMASYPEPEDTAGTLLAPESGRAVKEAEAS-PPSPGKGGG----TTPEKDPDAQKPPYSY
Fugu      MMATYQNPEDDAMALMVHDTN-TTKEKERP-KEEPVQDKVE-----EKDPDSQKPPYSY
Poisson zèbre MMATYPGHEDNGMILMDTTSSSAEKDRTKD--EAPPEKG-----PDKSDPTQKPPYSY
Poulet    MMSGYADGEEDAVAMLAHDGG-GSKEPERG-KEELSAEKG-----EKDPDSQKPPYSY
          **  *  *          *          *  **  *****

Homme      VALIAMAIRESAEKRLTSLGIYQYIIAKFPFYEKNNKGWQNSIRHNLSLNECFIKVPREG
Chèvre    VALIAMAIRESAEKRLTSLGIYQYIIAKFPFYEKNNKGWQNSIRHNLSLNECFIKVPREG
Souris    VALIAMAIRESAEKRLTSLGIYQYIIAKFPFYEKNNKGWQNSIRHNLSLNECFIKVPREG
Fugu      VALIAMAIRESSEKRLTSLGIYQYIISKFPFYEKNNKGWQNSIRHNLSLNECFIKVPREG
Poisson zèbre VALIAMAIRESSEKRLTSLGIYQYIISKFPFYEKNNKGWQNSIRHNLSLNECFIKVPREG
Poulet    VALIAMAIRESAEKRLTSLGIYQYIISKFPFYEKNNKGWQNSIRHNLSLNECFIKVPREG
          *****  *****  *****  *****  *****  *****

Homme      GGERKGNWTLDPACEDMFEEKGNRRRRMKRPFRRPPAHFQPGKGLFGAGGAAGCGVA
Chèvre    GGERKGNWTLDPACEDMFEEKGNRRRRMKRPFRRPPAHFQPGKGLFGAGGAAGCGVA
Souris    GGERKGNWTLDPACEDMFEEKGNRRRRMKRPFRRPPAHFQPGKGLFGSGGAAGCGVP
Fugu      GGERKGNWTLDPACEDMFEEKGNRRRRMKRPFRRPPPTHFQPGKSLFG-----
Poisson zèbre GGERKGNWTLDPACEDMFEEKGNRRRRMKRPFRRPPPTHFQPGKSLFG-----
Poulet    GGERKGNWTLDPACEDMFEEKGNRRRRMKRPFRRPPPTHFQPGKSLFGP-----
          *****  *****  *****  *****  *****  ***

Homme      GAGADGYGLAPPKYLQSGFLNNSWPLPQPPSPMPYASCQMAAAAAAAAAAAAAGPSP
Chèvre    GAGADGYGLAPPKYLQSGFLNNSWPLPQPPSPMPYASCQMAAAAAAAAAAAAAGPSP
Souris    GAGADGYGLAPPKYLQSGFLNNSWPLPQPPSPMPYASCQMAAAAAAAAAAAAAGPSP
Fugu      ---GDGYGLSPPKYLQSSFNNNSWSLQPPAPMSYTSQMAS-----GNVSP
Poisson zèbre ---EGYGLSPPKYLQSGFINNSWS----PAPMSYTSQVSS-----GSVSP
Poulet    ---DGYGLSPPKYLQSTFMNNSWPLPQPAPVPYASCQMSG--      ---GSVSP
          ****  *****  *  ****  *  *  *  *  *  *  *  **

Homme      GAAAVVKGLAGPAAASYGPYTRVQSMALPPGVVNSYNLGGPPAAPPAPP---HHPHPHA
Chèvre    GAAAVVKGLAGPAAASYGPYTRVQSMALPPGVVNSYNLGGPPAAPPAPP---HHPHSHA
Souris    GAAAVVKGLAGPAAASYGPYTRVQSMALPPGVVNSYNLGGPPAAPPAPP---HHPHPHA
Fugu      VN---VKGLSAP-TSYNPYSRVQSMALP-SMVNSYNGMS-----HHHHPAHP
Poisson zèbre VN---MKGLSAP-SSYNPYSRVQSIGLP-SMVNSYNGISHH-----HHHHHTHP
Poulet    VN---VKGLSGP-ASYGPYSRVQSVALP-GMVNSYNGVAHP-----HHPHA
          ***  *  **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Homme      HHLHAAAAPPAPPHHGAAAPPQQLSPASPATAAPPAPAPTSAPGLQFACARQP-ELAM
Chèvre    HHLHAAAAPPAPPHHGAAAPPQQLSPASPATAAPPAPAPTSAPGLQFACARQP-ELAM
Souris    HHLHAAAAPPAPPHHGAAAPPQQLSPASPATAAPPAPAPTSAPGLQFACARQP-ELAM
Fugu      H-----HAQQLS---PATAAPPVSSSNGAGLQFACSRQPAELSM
Poisson zèbre HAL-----PHAQQLSPA---TAAAPPVTTGNGTGLQFACSRQPAELSM
Poulet    HH-----PQQLGPASP---APPAAPAANGAGLQFACARQPAELSV
          *          **          *  *          *****  ***  **

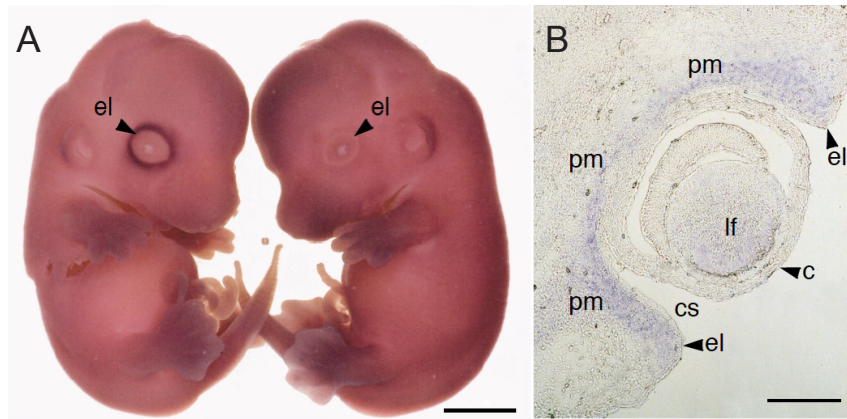
Homme      MHCSYWDHDSKTGALHSRLDL 376
Chèvre    MHCSYWDHDSKTGALHSRLDL 377
Souris    MHCSYWDHDSKTGALHSRLDL 375
Fugu      MHCSYWEHETKHSALHTRIDI
Poisson zèbre MHCSYWDHESKHSALHARIDI 306
Poulet    MHCSYWEHDSKHGALHSRIDI 305
          *****  *  *  *  *  *  *

```

➤ *Figure 23 : Alignement de la séquence protéique de Foxl2 chez les vertébrés*

Les acides aminés conservés sont notés avec une étoile (). Le domaine forkhead de liaison à l'ADN est noté en bleu. Foxl2 contient également un domaine polyalanine (représenté en rose). D'après (Cocquet et al. 2003).*

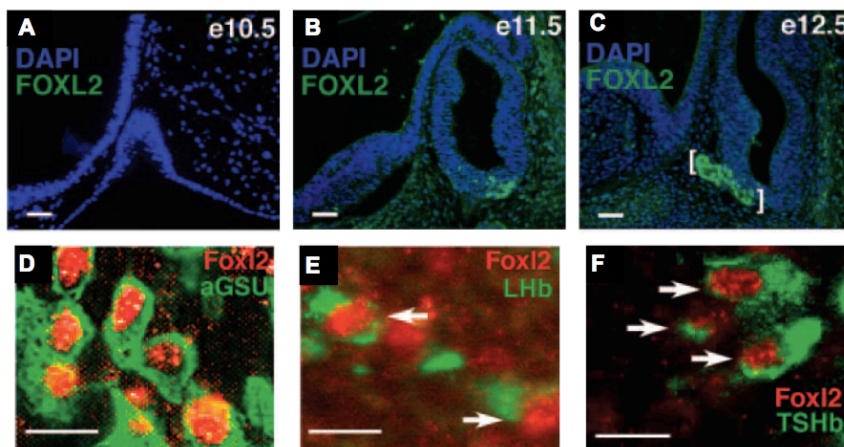
Chez la souris, au cours du développement, *Foxl2* est exprimé dans le mésenchyme péri-oculaire (Figure 24) et dans le noyau mésodermique des arcs pharyngiens 1-3 (Crisponi *et al.* 2001, Schmidt *et al.* 2004, Shi *et al.* 2014).



➤ **Figure 24: Expression de Foxl2 dans le mésenchyme péri-oculaire**

A : A E14.5 l'hybridation *in situ* avec les ARN anti-sens de Foxl2 montre un signal fort dans les paupières en développement (à gauche), la sonde contrôle ne montre aucun signal (droite). B : Hybridation *in situ* Foxl2 sur une section sagittale de l'œil à E14.5. L'expression est concentrée dans le mésenchyme périoculaire (pm). El : paupières, cs : sac conjonctival, lf : fibres cristallines. D'après (Crisponi et al. 2001).

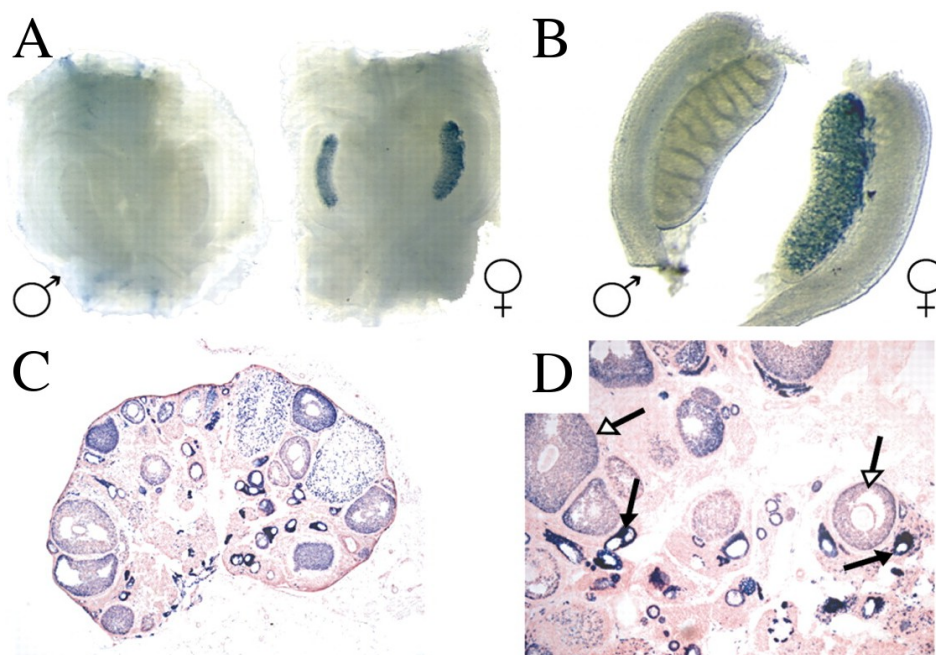
De plus, Foxl2 est aussi exprimé dans l'hypophyse durant le développement embryonnaire. Il apparaît à partir de E11.5 au niveau du lobe antérieur hypophysaire en développement. Cette expression persiste dans cette zone jusqu'à l'âge adulte. Des analyses plus précises montrent que Foxl2 est présent dans les cellules différenciées ou non, ce qui suggère un rôle dans la différenciation des cellules de l'hypophyse au cours du développement. Par la suite, Foxl2 est présent dans les cellules gonadotropes (sécrétrices de gonadotrophines), thyrotropes (sécrétrices de TSH) et une partie des cellules lactotropes au cours de la gestation (Ellsworth et al. 2006).



➤ **Figure 25: Profil d'expression de Foxl2 dans l'hypophyse**

Immunohistochimie dirigée contre Foxl2 sur des coupes d'hypophyse d'embryons de souris. A : absence d'expression à E10.5, B, C ; expression de Foxl2 en vert à E11.5 et E12.5. D, E, F : IHC de Foxl2 en rouge et des hormones d'intérêt en vert : D : α GSU marque les cellules gonadotropes, E : LHb marque les cellules lactotropes et F : TSHb marque les cellules thyrotropes. D'après (Ellsworth et al. 2006).

Foxl2 est l'un des premiers marqueurs de la différenciation ovarienne. Il est détecté dès le stade E12.5 chez la souris dans les cellules folliculaires ovariennes (Figure 26) (Schmidt *et al.* 2004). Cette expression est maintenue dans l'ovaire durant toute la vie fœtale et jusqu'à l'âge adulte où *Foxl2* est très fortement exprimé dans les cellules somatiques des follicules primordiaux. Durant la maturation folliculaire, son expression est maintenue et restreinte dans les cellules de la granulosa des follicules à des stades précoces puis diminue progressivement dans les follicules matures (Figure 26). La présence de *Foxl2* de manière précoce dans les ovaires est aussi observée chez d'autres espèces n'appartenant pas aux mammifères telles que certains poissons : la truite arc-en-ciel et le tilapia (Wang *et al.* 2004, Baron *et al.* 2005), le poulet (Govoroun *et al.* 2004) et la tortue (Loffler *et al.* 2003). La conservation de ce profil et son expression précoce au niveau des gonades suggère un rôle prépondérant de *Foxl2* dans la différenciation et le développement ovarien.



➤ **Figure 26 : Profil d'expression de *Foxl2* dans les gonades chez la souris**

Détection de l'activité β -galactosidase de souris rapportrices *Foxl2*^{lacZ} chez des embryons à E12.5 (A,B) et adultes (C,D). Chez l'embryon, l'expression de *Foxl2* est détectée uniquement au niveau des ovaires. Chez l'adulte, l'expression est restreinte aux cellules de la granulosa avec un taux plus élevé dans les follicules primordiaux (flèches noires) et une diminution au cours de la maturation folliculaire (flèches blanches) (Schmidt *et al.* 2004).

2.2.2. Rôle de *Foxl2*

2.2.2.1. Mutations de *FOXL2* chez l'Homme

Des mutations de *FOXL2* ont été décrites chez l'Homme et sont responsables du syndrome du Blepharophimosis Ptôsis Epicanthus Inversus (BPES, OMIM #110100) qui peut être associé à une IOP (Harris *et al.* 2002, Kosaki *et al.* 2002, De Baere *et al.* 2003, Fokstuen *et al.* 2003, Loffler *et al.* 2003, Udar *et al.* 2003).

Le BPES est une maladie génétique rare qui touche 1/5000 naissances. Dans les cas familiaux, la transmission de la maladie répond majoritairement à un modèle autosomique dominant. Le BPES est caractérisé par quatre malformations palpébrales majeures présentes dès la naissance (Lawson *et al.* 1995). Les personnes atteintes de cette maladie présentent un rétrécissement de l'ouverture des yeux (blépharophimosis), des paupières tombantes (ptôsis), et un pli vers le haut de la peau de la paupière inférieure près du coin interne de l'œil (épicanthus inversus). En outre, il existe une distance accrue entre les coins intérieurs des yeux (télécanthus). Le ptôsis est dû à une dysplasie, ou l'absence du muscle élévateur de la paupière : le *levator palpebrae superioris* (LPS) (Figure 27) (Dollfus *et al.* 2003, Decock *et al.* 2011). En raison de ces anomalies, les paupières ne peuvent pas s'ouvrir complètement, et la vision peut être limitée. Les personnes atteintes peuvent aussi avoir certains traits du visage distinctifs dont une arête nasale large, oreilles basses, ou une distance raccourcie entre le nez et la lèvre supérieure (un philtrum court).

On distingue deux types de BPES en fonction de la présence d'une IOP (BPES de type I) ou non (BPES de type II) (Zlotogora *et al.* 1983). Quatre-vingt trois pour cent des patients présentant un BPES ont une mutation dans *FOXL2* (Beysen *et al.* 2005). Les mutations peuvent toucher la séquence codante (mutations intra-géniques) ou des séquence régulatrices (mutations extra-géniques). Les mutations intra-géniques représentent la majorité des mutations décrites dans ce gène. Des mutations faux-sens ont été observées essentiellement dans le domaine forkhead et induisent des modifications de la localisation subcellulaire de la protéine et de l'activité transcriptionnelle de *FOXL2* (Beysen *et al.* 2008). Les mutations non-sens conduisent à la formation d'une protéine tronquée dont l'activité est abolie ou très réduite en fonction de la position du codon stop. D'autres types de mutations trouvées sont des insertions/délétions ne modifiant pas le cadre de lecture de la protéine. C'est le cas, par

exemple, des expansions du domaine polyalanine, décrite dans 30% des patients atteints de BPES.

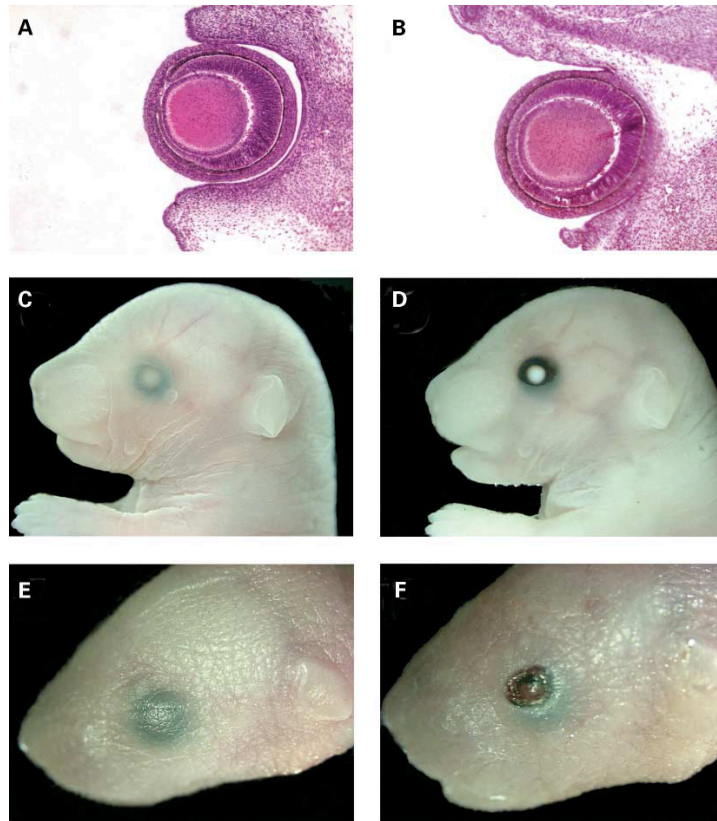


➤ **Figure 27: Malformation des paupières chez des patients BPES**

D'après (Verdin et al. 2012).

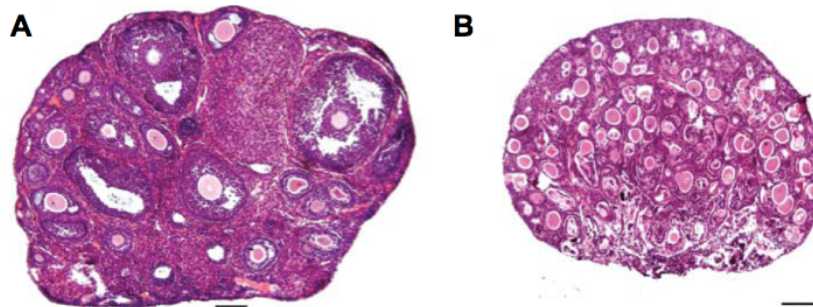
2.2.2.2. Les souris invalidées pour *Foxl2*

Chez la souris, l'inactivation homozygote de ce gène conduit à une létalité de 95% des animaux avant le sevrage. Ces animaux sont caractérisés par une taille réduite due à une diminution de 60% de la concentration sérique IGF1 (insulin growth factor) pouvant être due au défaut hypophysaire. Par ailleurs, ils présentent des malformations cranio-faciales sévères, caractérisées par une hypoplasie des paupières visible dès E13.5. De plus, les nouveaux-nés naissent avec les yeux ouverts. Les 5% qui survivent au sevrage peuvent vivre au-delà d'un an, mais les femelles *Foxl2*^{-/-} sont stériles (Schmidt *et al.* 2004, Uda *et al.* 2004). L'analyse des ovaires *Foxl2*^{-/-} montre que les follicules mutants sont bloqués au stade primordial et n'entame pas la maturation folliculaire (Figure 29). Les cellules de la granulosa restent aplaties et ne se différencient pas en cellules cuboïdales qui caractérisent les follicules primaires.



➤ **Figure 28: Phénotype palpébrale des souris *Foxl2*^{-/-}**

*A et B ; Histologie sur coupe d'œil de souris sauvage (A) et *Foxl2*^{-/-} (B) à E13.5. Souris à E17.5 (C-D) et à la naissance, sauvage (C,E) et *Foxl2*^{-/-} (D,F). D'après (Uda et al. 2004)*

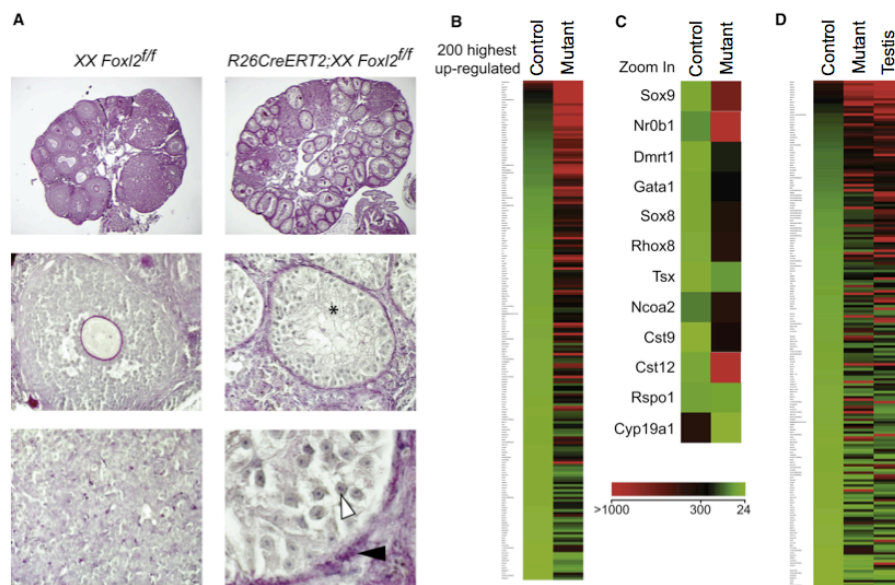


➤ **Figure 29: Phénotype ovarien des souris *Foxl2*^{-/-}**

*A : Ovaire de souris sauvage, B : Ovaire de souris *Foxl2*^{-/-}. Les ovaires des souris mutantes présentent un arrêt de la croissance folliculaire et les cellules somatiques apparaissent désorganisées avec un stroma réduit. D'après (Schmidt et al. 2004)*

Chez la chèvre, il a été montré que la mutation naturelle d'une région de 11,7 kilobases, appelée mutation PIS pour « polled intersex syndrome » incluant un élément régulateur affectant l'expression de *Foxl2* provoquait une inversion sexuelle des femelles XX en mâle. Ces chèvres ont une différenciation de type testiculaire incluant la différenciation des cellules de Sertoli et la formation de tubules séminifères (Pailhoux *et al.* 2001). L'inactivation de

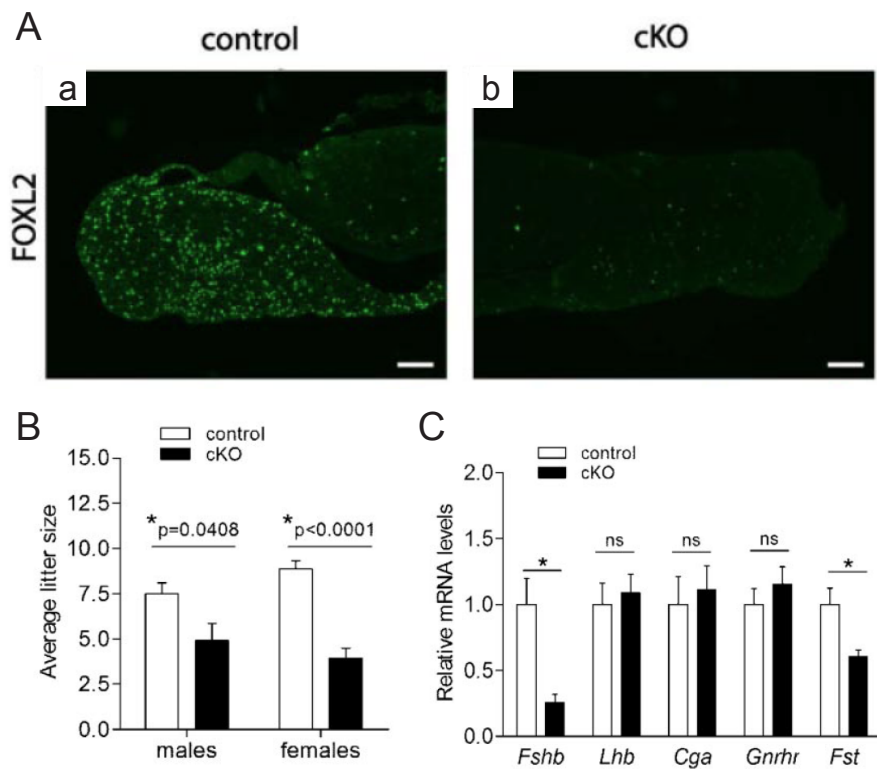
FOXL2 chez la chèvre obtenue par « genome editing » résume le phénotype PIS (Boulangier *et al.* 2014). Ces résultats suggèrent que *Foxl2* aurait aussi un rôle dans l'identité ovarienne. Une étude de Uhlenhaut et coll. montre que l'inactivation conditionnelle de *Foxl2* chez la souris dans des ovaires adultes provoque une réversion sexuelle partielle des ovaires (Figure 30) (Uhlenhaut *et al.* 2009). Dans cette étude, l'équipe montre que l'expression de *Foxl2* est nécessaire pour le maintien de l'identité ovarienne et empêche la transdifférenciation d'un ovaire adulte en testicule. En effet, l'inactivation de *Foxl2* dans des ovaires adultes induit une expression de marqueurs testiculaires dont *Sox9* (cible de *Sry*). Ils observent une reprogrammation des cellules de la granulosa en cellules de type Sertoli et Leydig et des taux de testostérone similaires aux frères de portée XY (Figure 30) (Uhlenhaut *et al.* 2009). Ces résultats montrent pour la première fois que le phénotype ovarien est un processus actif qui doit être maintenu tout au long de la vie.



➤ **Figure 30 : Réversion sexuelle des gonades XX des mutants conditionnels *Foxl2***

(A) Histologie des gonades XX du contrôle *Foxl2^{ff}* (panneaux de gauche) et des gonades XX du mutant conditionnel *R26CreERT2;Foxl2^{ff}* (panneaux de droite) trois semaines après traitement au tamoxifène induisant la recombinaison. On peut remarquer différentes caractéristiques des cellules de Sertoli telles que des extensions cytoplasmiques (*), des nucléoles tripartites et une lame basale importante (flèche noire). (B) Analyse comparative globale de l'expression génique des gonades XX *Foxl2^{ff}* (control) et XX *R26CreERT2;Foxl2^{ff}* (mutants) trois semaines après traitement au tamoxifène. (C) Zoom de l'analyse montrée en (B) montrant l'augmentation d'expression de *Sox9*. (D) Analyse comparative de l'expression génique des ovaires contrôles et mutants avec un profil testiculaire. On remarque que les gonades XX *R26CreERT2;Foxl2^{ff}* acquièrent un profil d'expression génique beaucoup plus proche d'un profil testiculaire que d'un profil ovarien. Les couleurs (de vert à rouge) représentent des niveaux d'expression absolue (Uhlenhaut *et al.* 2009).

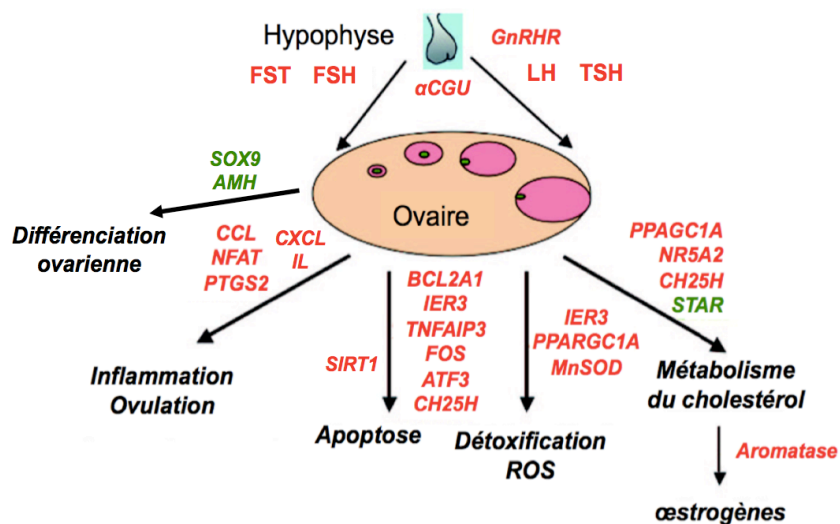
Mais ce n'est pas la seule fonction que *Foxl2* joue dans la reproduction. Ce facteur de transcription est aussi exprimé dans les cellules gonadotropes et thyroïdiques de l'hypophyse chez l'adulte (Cocquet *et al.* 2002, Ellsworth *et al.* 2006). L'inactivation conditionnelle de *Foxl2* spécifique dans les cellules gonadotropes conduit à une réduction de la fertilité. Chez les mâles, on observe une réduction de la taille des testicules et la spermatogénèse est réduite. Pour les femelles, on observe une diminution de la taille des ovaires et l'ovulation est moindre. Ces atteintes au niveau des gonades sont liées à la déficience en FSH de ces souris mutantes, plus particulièrement dans la diminution de la synthèse de la sous-unité Fsh β . Foxl2 agit donc aussi sur la production de FSH β hypophysaire (Tran *et al.* 2013).



➤ **Figure 31: Inactivation conditionnelle de *Foxl2* dans l'hypophyse**

A : Immunohistochimie anti-*Foxl2* dans l'hypophyse des souris contrôles (*control*) et mutantes conditionnelles (*cKO*). *B* : La taille des portées est réduite chez les mutants, *C* : L'expression de *Fshb* et *Fst* sont réduites chez les mutants mâles et femelles. D'après (Tran *et al.* 2013).

2.2.3. Les cibles transcriptionnelles de Foxl2



➤ **Figure 32: Cibles transcriptionnelles de Foxl2 dans l'hypophyse et les ovaires**

Foxl2 régule la synthèse des gonadotrophines 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 (Batista et al. 2007, Benayoun et al. 2011).

2.2.3.1. Cibles ovariennes de Foxl2

Considérant la fonction critique de *Foxl2* dans la différenciation ovarienne, des gènes cibles ont été identifiés en utilisant des analyses à haut débit sur des modèles humain et murin. Dans le contexte ovarien, *Foxl2* régule l'homéostasie du cholestérol et la synthèse des hormones stéroïdes par la régulation de *Star* et de l'*Aromatase* (Pannetier et al. 2006, Bouhali et al. 2011). Il joue aussi un rôle dans la détermination ovarienne en inhibant *Sox9* et l'*AMH*. Il agit sur la folliculogénèse en interagissant directement avec la protéine NOBOX (Bouilly et al. 2014), sur l'ovulation en activant *Ptgs2* et sur la réponse au stress et l'apoptose en régulant *Sirt1*, *MnSOD*, *Tnfaip3* et *Fos* (Batista et al. 2007).

2.2.3.2. Cibles hypophysaires

Ellsworth et ses collaborateurs ont déterminé les cibles de *Foxl2* dans l'hypophyse de souris (Ellsworth et al. 2003, Ellsworth et al. 2006) (Figure 32). *Foxl2* régule l'expression du gène

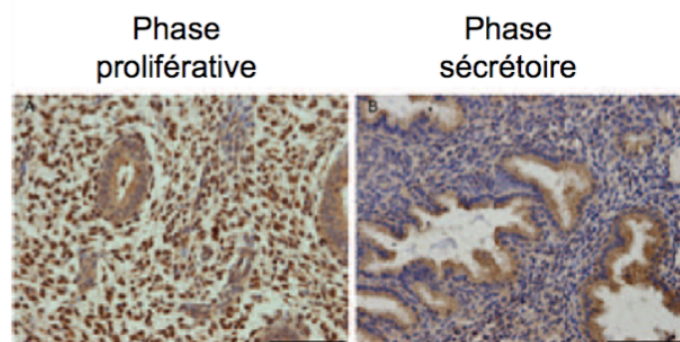
codant pour le récepteur de la GnRH ainsi que le gène *Cga* codant pour la sous-unité alpha commune aux gonadotrophines (α -LH, α -FSH et α -TSH).

Par ailleurs, d'autres études ont montré que *Foxl2* était un régulateur indirect de la synthèse de la sous-unité β de la LH et de la FSH (Blount *et al.* 2009, Tran *et al.* 2013). Cette régulation se fait en dimère avec Smad3 et régule l'expression de la follistatine. La follistatine est un régulateur de l'activité des facteurs de croissance de type TGF β , synthétisés par des cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure. La follistatine régule en aval la synthèse des sous-unités β de la LH et de la FSH. De plus *Foxl2* régulerait également de façon directe l'expression de la sous-unité β de la FSH (Blount *et al.* 2009, Tran *et al.* 2013).

2.3. *Foxl2* et *Dlx5/6* dans l'utérus

2.3.1. *Foxl2* dans l'utérus

Des études chez l'Homme (Talbi *et al.* 2006, Governini *et al.* 2014) ont montré que la protéine FOXL2 était présente dans l'endomètre. L'étude de Talbi et coll. explorant par biopuces l'expression du génome entier durant le cycle menstruel a révélé une expression élevée de *FOXL2* durant la phase proliférative. Une autre étude de Governini et coll. a localisé la protéine dans le stroma et l'épithélium glandulaire (Figure 33) (Governini *et al.* 2014).

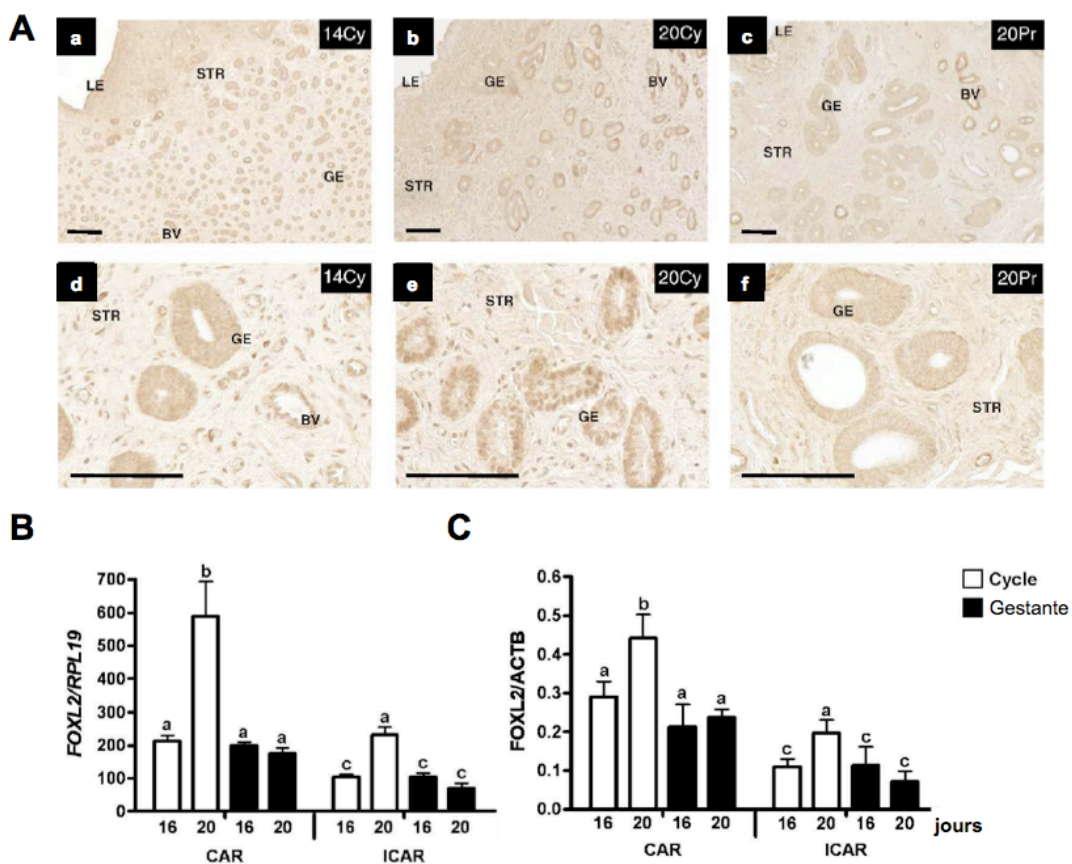


➤ **Figure 33: Expression de FOXL2 dans l'endomètre humain**

Immunohistochimie dirigée contre la protéine FOXL2 sur des endomètres de patientes en phase proliférative et sécrétoire. On note un marquage (marron) cytoplasmique de Foxl2 dans le stroma et dans l'épithélium glandulaire en phase proliférative. Ce marquage est surtout visible dans l'épithélium en phase sécrétoire. D'après Governini et al. 2014.

Chez le bovin, une étude a pu révéler la présence du transcrite et de la protéine de *FOXL2* dans l'endomètre durant le cycle œstral et que son expression augmentait durant la phase

correspondant à la dégradation du corps jaune (phase lutéolytique). Les études en immunohistochimie ont montré que durant le cycle, Foxl2 était présent dans le stroma, dans l'épithélium glandulaire et dans l'endothélium vasculaire. Dans cette étude, il a été vu que la supplémentation de progestérone induisait la répression de *FOXL2*. Durant le cycle, la protéine Foxl2 change de localisation subcellulaire dans l'épithélium glandulaire: cytoplasmique durant la phase folliculaire, il devient nucléaire durant la phase lutéolytique. Durant la période de gestation son expression diminue. Ces données suggèrent que *Foxl2* est régulé négativement par la progestérone et que c'est par ce mécanisme qu'il est inhibé durant la gestation (Eozenou *et al.* 2012) (Figure 34).



➤ **Figure 34: Expression de Foxl2 dans l'utérus bovin**

A : Immunohistochimie dirigée contre la protéine Foxl2 à 14 (a,d), 20 jours (b, e) de cycle et 20 jours de gestation. (c,f) Foxl2 est localisé dans les cellules stromales (STR) de manière nucléaire et dans l'épithélium glandulaire de manière cytoplasmique à 14 jour de cycle (a,d) et nucléaire à 20 jours de cycle (b,e). Durant la gestation, la protéine Foxl2 n'est plus présente (c,f). *B* : qPCR montrant la quantification relative des ARNm de Foxl2 dans les zones carenculaires (CAR) et intercarenculaire (ICAR), durant le cycle ou pendant la gestation. *C* : Quantification relative de la protéine par Western Blot durant le cycle et pendant la gestation. On note une diminution des ARNm et des protéines durant la gestation et une augmentation à 20 jours du cycle correspondant à la chute de progestérone. D'après (Eozenou *et al.* 2012).

2.3.2. *Dlx5* dans l'utérus

Le gène *DLX5* chez la femme est aussi exprimé dans l'endomètre. Son expression est particulièrement élevée durant les phases sécrétoires précoces et tardives, correspondant à une période de forte activité glandulaire (Talbi *et al.* 2006). Des études d'analyse de transcriptome sur certaines pathologies de l'endomètre chez la femme ont montré que l'expression de *DLX5* est augmenté de l'ordre de 3 fois sur des analyses de biopuces réalisées dans l'endomètre des patientes atteintes d'adénocarcinomes endométraïdes, un type de cancer caractérisé par la prolifération anarchique de glandes, comparé aux endomètres sains (Maxwell *et al.* 2005). Dans une autre pathologie, l'endométriose, qui se caractérise par la présence de tissu endométrial en dehors de la cavité utérine, il a été remarqué que l'expression de *DLX5* diminue de l'ordre de 15 fois comparée aux endomètre sains (Hu *et al.* 2006).

Ces données suggèrent que *Foxl2* comme *Dlx5* et *Dlx6* joueraient un rôle central dans la reproduction à différents niveaux : hypophysaire ; ovarien et utérin. Cependant aucune étude n'a pu démontré leurs rôles exacts dans l'utérus.

L'objectif de mon travail de thèse a été de déterminer en partie, les rôles de ces facteurs de transcription dans l'utérus chez la souris.

Résultats

1. INTRODUCTION AUX TRAVAUX DE THESE

Mes travaux font suite à l'étude de Bouhali et coll. réalisée dans notre laboratoire, qui a mis en évidence que *Dlx5* et *Dlx6* étaient présents dans les ovaires adultes et que leur diminution allélique provoquait une diminution de la fertilité des femelles. Cette étude a pu montrer chez les femelles une anomalie de maturation des follicules ovariens associée à la dérégulation d'un autre gène, *Foxl2*. Suite à ces résultats, nous nous sommes intéressés de plus près à l'expression de ces facteurs de transcription dans les voies reproductives. Je me suis donc proposé d'étudier si ces gènes *Dlx5*, *Dlx6* et *Foxl2* sont présents dans l'utérus car aucune étude auparavant n'avait été réalisée.

L'hypothèse de départ est que ces deux gènes se régulant l'un l'autre dans les ovaires, ils pouvaient aussi interagir dans l'utérus. J'ai donc réalisé mes études sur *Dlx5/6* et *Foxl2* en parallèle afin de déterminer i) leur profil d'expression complet dans l'utérus depuis sa formation, ii) l'effet de leur inactivation conditionnelle dans les voies reproductives, iii) si une interaction entre ces facteurs était possible dans l'utérus.

Pour cela, j'ai utilisé une approche de modèle murin. Tout d'abord, j'ai réalisé un profil d'expression complet de ces gènes en utilisant des souris rapportrices LacZ. J'ai pu voir dans cette étude que *Dlx5* était exprimé dès E15.5 dans l'épithélium des canaux de Müller au niveau de la partie qui donnera le futur utérus et que *Foxl2*, lui, commençait à être exprimé dans l'utérus dans le mésenchyme dès la naissance. Poursuivant mon analyse, j'ai pu voir que ces gènes étaient aussi présents durant la maturation post-natale de l'utérus jusqu'à chez l'adulte, suggérant un rôle dans le développement et la fonction de l'utérus. Les souris inactivées pour *Dlx5/6* meurent à la naissance et l'inactivation de *Foxl2* provoque une forte létalité péri-natale. Afin de voir l'implication dans le développement post-natale utérin, j'ai utilisé le système Cre-LoxP et ainsi généré un modèle d'inactivation conditionnelle où la cre-recombinase est sous le contrôle du promoteur du récepteur 2 de la progestérone, qui est actif dès les premiers jours de la naissance dans l'utérus. En parallèle de ces études, j'ai pu participer à l'analyse des causes des malformations craniofaciales provoquées par l'absence de *Foxl2* chez les souris invalidées pour ce gène.

2. RESUME DE L'ARTICLE 1

2.1. *Foxl2* est exprimé dans l'utérus dès la naissance et persiste jusqu'à chez l'adulte

Dans cette étude, j'ai montré que *Foxl2* était exprimé dans les voies génitales à partir de E15.5 dans les parties correspondantes au futur cervix et aux oviductes (Article1 Figure 1A, B). A la naissance, *Foxl2* s'exprime dans le mésenchyme utérin (Article1 Figure 1C), puis durant la maturation post-natale, il est présent dans le stroma et la partie profonde du myomètre en développement. Chez l'adulte, il est présent uniquement dans le stroma, mais il est absent du myomètre (Article1 Figure 1C).

2.2. Les cellules *Foxl2* positives donnent naissance à la partie profonde du myomètre interne et à la paroi des vaisseaux sanguins.

Une étude de lignage a pu déterminer la contribution des cellules ayant exprimé *Foxl2* aux différentes couches tissulaires de l'utérus. J'ai pu voir que les cellules qui avaient exprimé *Foxl2* participaient à la formation du stroma, de la couche profonde du myomètre et de la couche musculaire entourant les vaisseaux (Article1 Figure 2).

2.3. L'inactivation conditionnelle de *Foxl2* dans l'utérus provoque une infertilité

Afin d'analyser le rôle de *Foxl2* durant la maturation post-natale de l'utérus, j'ai étudié l'inactivation conditionnelle de ce gène sur les souris *Pgr^{cre / +} ; Foxl2^{flox / flox}*. J'ai pu observer que les souris adultes étaient infertiles (Article1 Tableau1), malgré une fonction ovarienne apparemment normale (Article1 Suppl. Figure 2). Aucun site d'implantation n'est observé dans les utérus à E5.5, suggérant que l'infertilité serait due à un problème d'implantation.

2.4. Inactivation conditionnelle de *Foxl2* dans l'utérus provoque une architecture anormale du tissu et un défaut de formation de la couche de cellules musculaires entourant les artères

Les analyses des utérus des souris *Pgr^{cre / +} ; Foxl2^{flox / flox}* à plusieurs âges (PN6, 15, 25 et chez l'adulte) ont montré une diminution de la couche stromale, une hypertrophie et une désorganisation du myomètre dès le début de la maturation post-natale (Article1 Figure 4 et Figure 5). Chez l'adulte, on observe une couche de muscles supplémentaire dans la partie profonde du myomètre. De plus, on observe un défaut de formation des couches musculaires

entourant les vaisseaux dans l'utérus (Article1 Figure 6). Ces résultats montrent que l'expression de *Foxl2* dans le mésenchyme durant la maturation utérine est nécessaire à la différenciation du stroma et du myomètre, ainsi qu'à leur organisation. Ces défauts d'organisation de la couche musculaire pourraient expliquer en partie l'infertilité, car chez la femme, il a été observé que l'hypertrophie de ce tissu était associée à une infertilité.

2.5. Effet de l'inactivation de Foxl2 sur des gènes clés impliqués dans la maturation post-natale

Chez les mutants *Pgr*^{cre/+}; *Foxl2*^{flox/flox}, on note une modification de l'expression de certains gènes impliqués dans le développement post-natal, en particulier *Wnt7a*, qui joue un rôle dans la formation du myomètre et régule d'autres gènes *Wnt*. Nous avons constaté que, dans les utérus *Pgr*^{cre/+}; *Foxl2*^{flox/flox}, certains gènes de la famille *Wnt* sont touchés: *Wnt4* et *Wnt7a* sont augmentés à PN15, tandis que tous les autres *Wnts* sont diminués (*Wnt11* à PN15, *Wnt5a* à PN25 et *Wnt16* à tous les âges). La perturbation de ce réseau complexe de régulation montre que *Foxl2* agit sur la différenciation post-natale en régulant ces signaux.

En conclusion, *Foxl2* est exprimé dès la naissance dans le mésenchyme et permet le développement et l'organisation du stroma et du myomètre ainsi que la formation de la couche musculaire entourant les artères. Durant la maturation, *Foxl2* agit sur la régulation de certains gènes *Wnt* agissant sur la maturation post-natale.

3. ARTICLE 1

Role of *Foxl2* in uterine maturation and function

Brice Bellessort, Anne Bachelot, Églantine Heude, Gladys Alfama, Anastasia Fontaine, Marine Le Cardinal, Mathias Treier and Giovanni Levi

Human Molecular Genetics, 2015 Feb 15. pii: ddv061

ORIGINAL ARTICLE

Role of *Foxl2* in uterine maturation and functionBrice Bellessort¹, Anne Bachelot¹, Églantine Heude¹, Gladys Alfama¹, Anastasia Fontaine¹, Marine Le Cardinal¹, Mathias Treier² and Giovanni Levi^{1,*}¹Évolution des Régulations Endocriniennes, CNRS UMR 7221, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris 75005, France and ²Max-Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC), Genetics of Metabolic and Reproductive Disorders, Robert-Rössle-Str. 10, Berlin 13125, Germany

*To whom correspondence should be addressed at: CNRS UMR7221, Evolution des Régulations Endocriniennes, Muséum National d'Histoire Naturelle, 7 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France. Tel: +33 1 40793621; Fax: +33 1 40793618; Email: glevi@mnhn.fr

Abstract

Foxl2 codes for a forkhead/HNF3 transcription factor essential for follicular maturation and maintenance of ovarian identity. FOXL2 mutations are associated with Blepharophimosis, Ptosis and Epicanthus inversus Syndrome (BPES) characterized by eyelid malformations (types I and II) and premature ovarian insufficiency (type I). We show that *Foxl2* is not only expressed by the ovary, but also by other components of the mouse female reproductive tract, including the uterus, the cervix and the oviduct. In the uterus, *Foxl2* expression is first observed in the neonatal mesenchyme and, during uterine maturation, persists in the stroma and in the deep inner myometrial layer (IML). In the adult, *Foxl2* is expressed in the differentiated stromal layer, but no longer in the myometrium. Conditional deletion of *Foxl2* in the postnatal (PN) uterus using Progesterone Receptor-cre (*Pgr^{cre/+}*) mice results in infertility. During PN uterine maturation *Pgr^{cre/+}; Foxl2^{lox/lox}* mice present a severely reduced thickness of the stroma layer and an hypertrophic, disorganized IML. In adult *Pgr^{cre/+}; Foxl2^{lox/lox}* mice a supplementary muscular layer is present at the stroma/myometrium border and vascular smooth muscle cells fail to form a coherent layer around uterine arteries. Wnt signalling pathways play a central role in uterine maturation; in *Pgr^{cre/+}; Foxl2^{lox/lox}* mice, Wnt genes are deregulated suggesting that *Foxl2* acts through these signals. In humans, thickening of the IML (also called “junctional zone”) is associated with reduced fertility, endometriosis and adenomyosis. Our data suggest that *Foxl2* has a crucial role in PN uterine maturation and could help to understand sub-fertility predisposition in women.

Introduction

In all mammals, the uterus develops as a specialization of the paramesonephric or Müllerian ducts, which gives rise to the infundibula, oviducts, uterus, cervix and anterior vagina (1). The mature uterine wall is composed of two functional compartments, the endometrium and the myometrium. The endometrium is constituted by a simple columnar luminal epithelium (LE) surrounded by a fibroblastic stroma and endometrial glands (EG) which secrete factors required for the establishment of uterine receptivity and embryo implantation (2–5). The stroma is surrounded externally by the myometrium, a muscular structure constituted by three different layers: the circularly oriented

inner myometrial layer (IML), also called junctional zone (JZ) in human MRI imaging, the vascular myometrial layer and the longitudinally oriented outer myometrial layer (OML). Myometrial contractions, driven by the IML (or the JZ in humans) are essential for trophoblast invasion, sperm transport and parturition (6). At birth, the mouse uterus lacks EG and muscles, and consists of a simple epithelium supported by undifferentiated mesenchyme. The complex processes of neonatal uterine differentiation and uterine gland formation are regulated by epithelium/mesenchyme interactions, which involve the extracellular matrix, growth factors-mediated signals and expression of steroid hormone receptors (7). Adenogenesis begins at postnatal day 5 (PN5), from epithelial invaginations, which lead to the formation

Received: January 19, 2015. Revised: February 10, 2015. Accepted: February 11, 2015

© The Author 2015. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

of GE (glandular epithelium) buds and results in the development of simple tubular glands lined by a simple cuboidal epithelium (8). During postnatal (PN) development, the neonatal mesenchyme differentiates into two layers: the endometrial stroma and the myometrial muscular layers. Mouse uterine myogenesis begins at PN3 when the oriented outer mesenchymal cells differentiate into bundles of smooth muscle cells, prefiguring the IML. At PN15, the inner, outer and vascular myometrial layers are already formed and the maturation phase continues by the growth of these individual layers. The mouse uterus is fully mature around PN30 (9).

FOXL2 codes for a forkhead/HNF3 transcription factor that displays a highly conserved expression in the vertebrate ovary (10). In humans, FOXL2 mutations cause the autosomal dominant Blepharophimosis–Ptosis–Epicanthus inversus Syndrome (BPES) (OMIM ID: 110100) (11). A large spectrum of FOXL2 mutations has been identified and two types of BPES have been described. Both forms of BPES are characterized by oculo-facial dysmorphism, which, in BPES type I, is also associated to premature ovarian insufficiency (POI). Several mouse models carrying targeted *Foxl2* mutations have been generated (12–14). Homozygous females show dysmorphic eyelids/foreheads (15) and are infertile, due to an early impairment of follicular development and a defect in primordial follicle individualization (13). It has been shown that *Foxl2* regulates the expression of genes involved in the control of steroidogenesis (16,17). *Foxl2* interacts with Steroidogenic Factor-1 (SF-1) and inhibits the expression of both *CYP17* (16) and *StAR* (18), and activates the expression of *Cyp19a1* (aromatase) (19), suggesting that its involvement in POI might result from a misregulation of steroid biosynthesis.

Recent studies show that, beside the ovary, where *Foxl2* is expressed in early ovarian follicles and by granulosa cells (18,20), strong expression also occurs in the endometrium. High-throughput profiling experiments of human endometrium show that the highest levels of FOXL2 expression are reached during the proliferative phase (21). Uterine expression of *Foxl2* is also supported by studies in the bovine where the gene is negatively regulated by progesterone (22). In human and in bovine endometrium, immunodetection of FOXL2 protein has suggested its localization in the stroma and in GE (22,23). Furthermore, FOXL2 is overexpressed in endometriosis, a human pathology characterized by the presence of ectopic endometrial tissue outside the uterine cavity (23). Despite these data, the possible role of FOXL2 in uterine maturation and function has not yet been explored.

Here, we show that stromal uterine cells (SC) express *Foxl2* throughout PN development. Using a mouse model in which *Foxl2* is conditionally deleted in the uterus we show that this transcription factor is essential for several aspects of normal uterine maturation including myometrial and vascular formation. *Foxl2* uterine deletion results in infertility. Our findings might implicate *Foxl2* in reproductive disorders of the uterus and should be taken into consideration when counselling BPES patients undergoing *in vitro* fertilization.

Results

Uterine expression of *Foxl2*

The distribution of *Foxl2* during uterine development was analysed in *Foxl2^{LacZ/+}* mice (12). At 18.5 days post coitum (E18.5), *Foxl2* is expressed by the ovary, the oviduct and the cervix, but not by the uterus (Fig. 1A, right panel). *Foxl2* expression is first detected in the uterus at birth (Fig. 1A; left panel) and persists in the ovary, oviduct and cervix (Fig. 1B). In the uterus, during early PN

maturation (Fig. 1C; PN3, PN5 central panel), *Foxl2* is detected in mesenchymal cells which are precursors of stroma and myometrial smooth muscle cells. To discern stromal and myometrial expression of *Foxl2*, we detected, by immunohistochemistry (IHC), the expression of smooth muscle actin α (SMA α) (Fig. 1C, right panel). During early PN maturation (Fig. 1C; PN3, PN5 right panel), *Foxl2* is expressed by mesenchymal precursors of the stroma (9) and by few smooth muscle cells at the border between the uterine mesenchyme and the early myometrium (arrowheads Fig. 1C). At later maturation stages (PN8–PN12), *Foxl2* expression persists in the stroma and in the deep part of the IML (arrowheads). In the adult, *Foxl2* is expressed by stroma cells and blood vessel walls (Fig. 1C, lower lane), but is no longer detected in the myometrial layer. The uterine distribution of *Foxl2* is also confirmed by *in situ* hybridization and IHC in the adult (Supplementary Material, Fig. S1 and Fig. 3C).

Foxl2-positive cells give rise to the inner part of the IML and to uterine blood vessels walls

Early mesenchymal cells of the uterus are known to be precursors of both the stroma and the myometrium (9). To analyse the contribution of *Foxl2*-positive precursors to different components of the uterus, we used *Foxl2^{cre/+}; R26R^{LacZ/+}* mice in which all derivatives of *Foxl2*-positive cells are *lacZ* positive. Our results show that *Foxl2*-positive precursors generate: (a) most stroma cells, (b) SMA α -positive cells of the deep IML (arrowheads) and (c) uterine blood vessels (arrows) (Fig. 2). These findings support the notion that the deep IML and uterine vascular smooth muscle cells (VSMCs) surrounding blood vessels both derive from *Foxl2*-positive progenitors in the stroma. A small subpopulation of luminal epithelial cells appears also to derive from *Foxl2*-positive precursors (small arrows, Fig. 2D); this is in line with the reported contribution of stroma stem cells derivatives to the LE (25).

Foxl2 conditional inactivation in the uterus

In order to analyse the role of *Foxl2* in PN maturation of the uterus, we crossbred mice carrying a *Foxl2* conditional allele (*Foxl2^{fllox/fllox}*) (14), with the Progesterone Receptor-Cre knockin (*Pgr^{cre/+}*) mice (26) in which the *Cre-recombinase* gene is expressed in the epithelium and in the stroma of the PN uterus (27). As the *Pgr* promoter is also active in the granulosa of antral follicles (28) and in the pituitary gland (29), we verified the tissue-specific pattern of recombination of *Foxl2* in our mice. In *Pgr^{cre/+}; Foxl2^{fllox/fllox}* mice at PN25 the recombinant allele was detected only in the uterus, but not in the ovary or in the pituitary gland (Fig. 3A). At this stage, *Pgr* is not expressed in the granulosa of immature follicles and in the pituitary of prepubescent females (26,30).

As expected, neither *Foxl2* mRNA nor *Foxl2* protein were detected in the uterus of *Pgr^{cre/+}; Foxl2^{fllox/fllox}* mice (Fig. 3B, C and Fig. 7).

Pgr^{cre} driven *Foxl2* inactivation results in infertility

Pgr^{cre/+}; Foxl2^{fllox/fllox} females are not fertile. Interestingly, the analysis of daily vaginal smears in the two weeks following sexual maturation showed a normal oestrus cycle and vaginal plugs were present after mating with WT males indicating a normal sexual behaviour and a normal ovarian function. Ovaries of mature mutant and WT mice were similar, with the presence of all classes of follicles and corpora lutea (Supplementary Material,

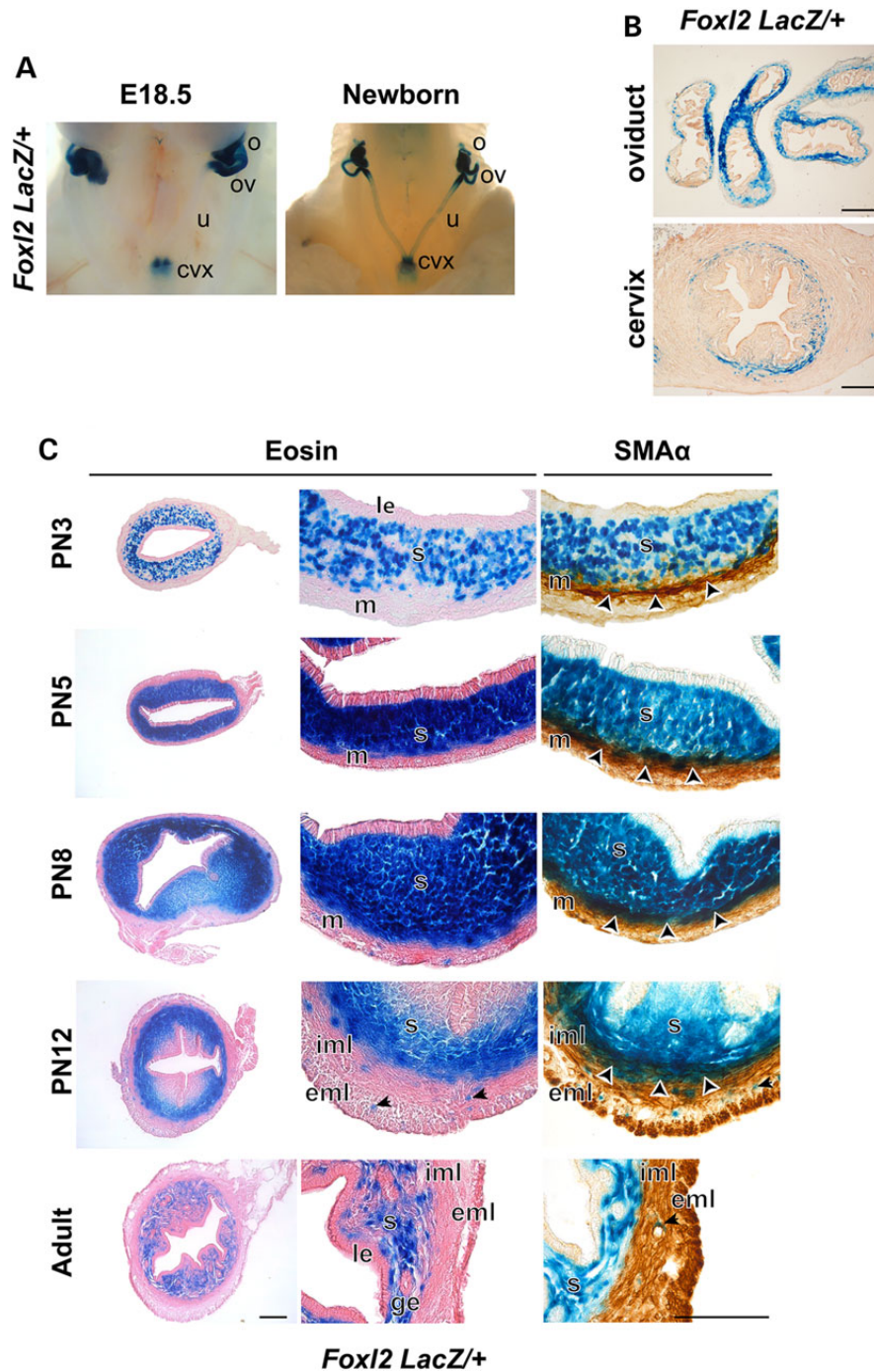


Figure 1. Foxl2 expression during uterine maturation. (A) LacZ expression in the reproductive tract of female Foxl2^{LacZ/+} mice at E18.5 and at birth. Before birth Foxl2 is expressed in the oviduct, the ovary and the cervix; uterine expression begins only at birth. (B) LacZ expression in the adult oviduct and cervix of female Foxl2^{LacZ/+} mice. (C) LacZ expression in Foxl2^{LacZ/+} mice during PN development and in the adult. During PN development, Foxl2 is expressed by most SC (s), by cells surrounding blood vessels (small arrows) and by the deep IML (arrowheads). In the adult, no Foxl2 expression was detected in the myometrium. Left and central panels counterstained with eosine; right panels, IHC with anti-SMA α antibodies. cvx: cervix, eml: external myometrial layer, ge: glandular epithelium, iml: inner myometrial layer, le: luminal epithelium, m: myometrium, o: ovary, ov: oviduct, s: stroma, u: uterus; small arrows: β -gal positive blood vessels; arrowheads: positive zone for SMA α and β -gal. Scale bar: 100 μ m.

Fig. 2). Despite these apparently normal features, after crossing with WT males, adult *Pgr*^{cre/+}; Foxl2^{fllox/fllox} females never got pregnant (Table 1). Interestingly, the probability of generating a litter after mating, was strongly reduced (50%) for *Pgr*^{cre/+}; Foxl2^{fllox/+}

females when compared to *Pgr*^{+/+}; Foxl2^{fllox/fllox} littermates. At 5.5 days post coitum, no implantation sites were present in *Pgr*^{cre/+}; Foxl2^{fllox/fllox} uteri, histological analysis confirmed the absence of implanted embryos in mutants.

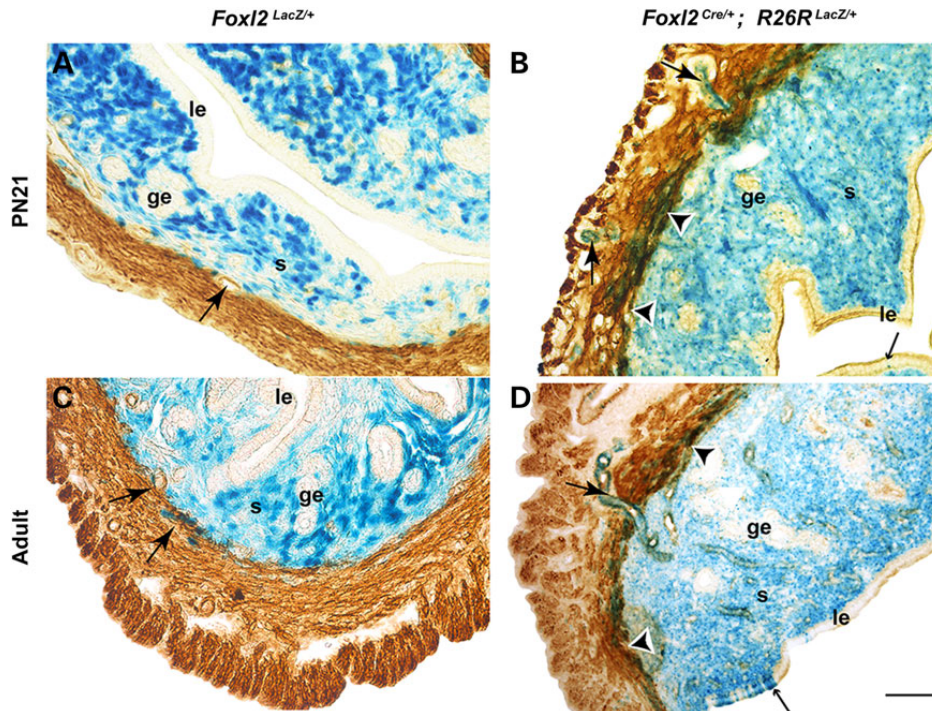


Figure 2. Lineage of *Foxl2*-positive precursors in the uterus. Uterine *LacZ* expression in PN21 and adult *Foxl2*^{LacZ/+} mice (A and C) compared to *Foxl2*^{Cre/+}; *R26R*^{LacZ/+} mice (B and D) counterstained with anti-SMA α antibodies. Vascular smooth muscle cells surrounding arteries (VSMCs, arrows) and smooth muscle cells of the deep IML (arrowheads) are *LacZ*-positive in B and D, therefore they derive from *Foxl2*-positive precursors. VSMCs and deep IML cells are not *LacZ*-positive in A and C suggesting a transient expression of *Foxl2*. In adult *Foxl2*^{Cre/+}; *R26R*^{LacZ/+} mice, groups of *LacZ*-positive cells are also present in the LE (small arrow), suggesting that they derive from *Foxl2*-positive precursors. Abbreviations as in Figure 1. Scale bar: A and B: 50 μ m, C and D: 100 μ m.

Conditional inactivation of *Foxl2* in the uterus results in abnormal tissue architecture

At all ages analysed (PN6, PN15, PN25 and adult) the IML of *Pgr*^{cre/+}; *Foxl2*^{fllox/fllox} mice was hypertrophic and disorganized compared to age-matched controls and the border between the stroma and IML was not as sharply defined as in control uteri (Fig. 4). The LE and the external myometrial layer (EML) were apparently normal and the total uterine thickness was unchanged (Fig. 5A).

At PN6, in *Pgr*^{cre/+}; *Foxl2*^{fllox/fllox} mice, the SMA-positive cells of the IML occupied a large part of the uterine surface while the SMA-negative stromal layer, well-recognizable in control animals, was significantly reduced (Figs 4 and 5B). The stroma/IML border could not be clearly identified in mutant animals due to the presence of dispersed SMA-positive cells.

As PN15, the stromal layer was strongly reduced and the expanded SMA-positive IML layer occupied most of the uterine surface. Interestingly, in *Pgr*^{cre/+}; *Foxl2*^{fllox/fllox} mice, smooth muscle fibres of the deep IML were disorganized and did not follow the circular orientation of the IML.

At PN25, *Foxl2*-deleted uteri presented a clearly detectable stromal layer; however, the limit between the stroma and the IML was disorganized and not as clearly defined as in control animals. In the stroma of control animals SMA-positive cells were invariably associated to blood vessels while, in mutant animals, SMA-positive cells were associated to arteries only in a restricted region close to the stroma/IML border and most of them were dispersed throughout the stroma with no evident association to blood vessels.

In *Pgr*^{cre/+}; *Foxl2*^{fllox/fllox} adult animals, the IML remained disorganized, and was characterized by the presence of a supplementary, longitudinally oriented, muscular layer separating it

from the stroma (sml in Fig. 4). In *Pgr*^{cre/+}; *Foxl2*^{fllox/fllox} adults, no SMA-positive cells were present in the stroma while, in control adult animals, stromal blood vessels were invariably surrounded by SMA-positive cells.

In the uterus of PN15, PN25 and adult *Pgr*^{cre/+}; *Foxl2*^{fllox/fllox} animals, the SMA α -positive component was significantly larger than controls (Figs 4 and 5B). At PN15, the average thickness of the IML of mutant uteri was almost doubled while the average thickness of the stroma was reduced by more than 50% (Fig. 5B, P15). These significant uterine dysmorphologies persisted at PN25, after uterine maturation, and in the adult: the IML of mutant uteri was 2.4 times larger than controls at PN25 and 1.9 times in the adult; the thickness of the stroma was reduced for about 25% at both ages (Fig. 5B).

Foxl2 inactivation results in defects of the smooth muscle wall of uterine arteries

Most SMA α -positive cells present in the normal uterine stroma are VSMCs surrounding arteries and arterioles. Starting at PN25, the stroma of *Pgr*^{cre/+}; *Foxl2*^{fllox/fllox} uteri presented few, sparse, SMA-positive cells not obviously associated to blood vessels (Fig. 4 PN25, Adult).

We immunostained uterine sections with anti-CD31 (an endothelial cell marker of blood vessels) and anti-SMA α antibodies. In PN25 and adult control animals all stromal SMA α -positive cells are elongated and in close contact with major blood vessels confirming that they are VSMC. In contrast, in the stroma of *Pgr*^{cre/+}; *Foxl2*^{fllox/fllox} uteri, the CD31 and SMA α staining patterns are not juxtaposed indicating that SMA α -positive cells are not associated to blood vessels (Fig. 6A).

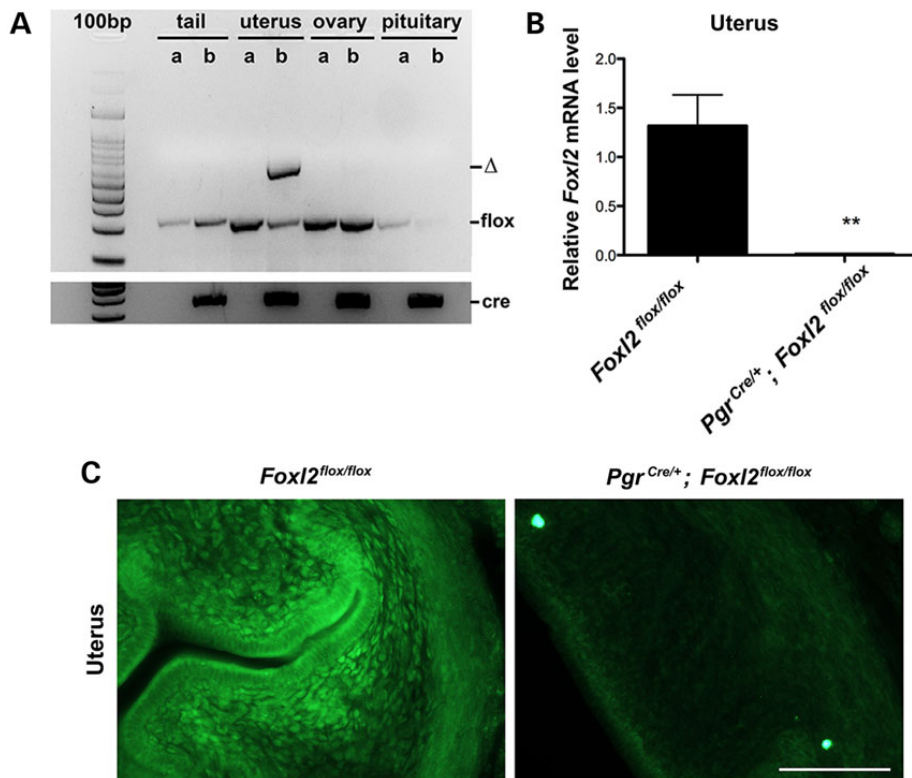


Figure 3. Post-natal deletion of *Foxl2* in the uterus. (A) At PN25, the floxed (*flox*) and the deleted (Δ) alleles of *Foxl2* (24) were detected by PCR in different tissues after crossing *Foxl2^{flox/flox}* females with *Pgr^{Cre/+}; Foxl2^{flox/+}* males; columns "a": tissues derived from *Foxl2^{flox/flox}* mice, columns "b": tissues derived from *Pgr^{Cre/+}; Foxl2^{flox/flox}* mice. The Δ allele was present in the uterus, but not in the ovary and in the pituitary where PGR-cre and *Foxl2* are expressed. (B) qPCR shows relative expression of *Foxl2* mRNA in *Foxl2^{flox/flox}* and *Pgr^{Cre/+}; Foxl2^{flox/flox}* uteri at PN25. Control gene: *Sdha*. *Foxl2* mRNA is no longer present in the cre-deleted uterus. (C) *Foxl2* IHC in *Foxl2^{flox/flox}* and in *Pgr^{Cre/+}; Foxl2^{flox/flox}* uteri at PN25. *Foxl2* protein is not present in the stroma of the cre-deleted uterus; background staining persists in the LE and in the myometrium. Scale bar: 100 μ m.

Table 1. *Foxl2* inactivation in the uterus leads to infertility

	Total of females crossed	Number of plugs	% of plug giving a litter	Average litter size (standard deviation)
<i>Pgr^{+/+}; Foxl2^{flox/flox}</i>	39	61	85.2	8.2 (\pm 1.62)
<i>Pgr^{Cre/+}; Foxl2^{flox/+}</i>	28	59	44.1	7.2 (\pm 1.22)
<i>Pgr^{Cre/+}; Foxl2^{flox/flox}</i>	8	14	0	0

Pgr^{Cre/+}; Foxl2^{flox/flox} were unable to give a litter after a successful cross with WT males. Note that the proportion of plug giving a litter of 85% in floxed mice is reduced to 44% in heterozygous mutant; that suggest the deletion of one allele of *Foxl2* in the uterus have an effect in the establishment of pregnancy. A same female was crossed 1–5 times.

3D reconstructions of confocal acquisitions show that, in mutant animals, most SMA α -positive cells are not in direct contact with blood vessels and fail to form VSMC layers (Fig. 6B and Supplementary Material, Fig. S3).

Effect of *Foxl2* inactivation on the expression of key genes of uterine maturation

After *Foxl2* inactivation, several key genes involved in uterine PN maturation were dysregulated (Fig. 7). In the uterus several *Wnt* genes are known to orchestrate PN maturation (7). In particular *Wnt7a* plays a role in myometrial formation (31) and regulates other *Wnt* genes and *Hoxa10* and *Hoxa11* (32), which play an important role in stromal proliferation. We found that, in *Pgr^{Cre/+}; Foxl2^{flox/flox}* uteri at PN6, PN15, PN25 most *Wnt* family genes are affected: *Wnt4* and *Wnt7a* are up-regulated at PN15, while all other *Wnts* are downregulated (*Wnt11* at PN15, *Wnt5a* at PN15

and PN25 and *Wnt16* at all ages). No variations were observed in the expression of *Hoxa10* and *Hoxa11*. *Msx1* and *Msx2* were downregulated at PN6 and PN15. As expected, in conditionally deleted uteri, *Foxl2* expression was not detectable at any age.

Discussion

Foxl2 is involved in myometrial differentiation

Foxl2 plays a central role in ovarian specification and physiology; mutations of this gene are associated with a specific form of POI. Here we show that *Foxl2* is also expressed at other levels of the female reproductive tract. In the uterus, *Foxl2* expression begins in the neonatal mesenchyme and persists up to adulthood in the stroma. We demonstrate by lineage analysis that the deep IML and VSMCs surrounding uterine arteries derive from *Foxl2*-positive mesenchymal precursors. Conditional inactivation of *Foxl2* in the uterus results in infertility associated with

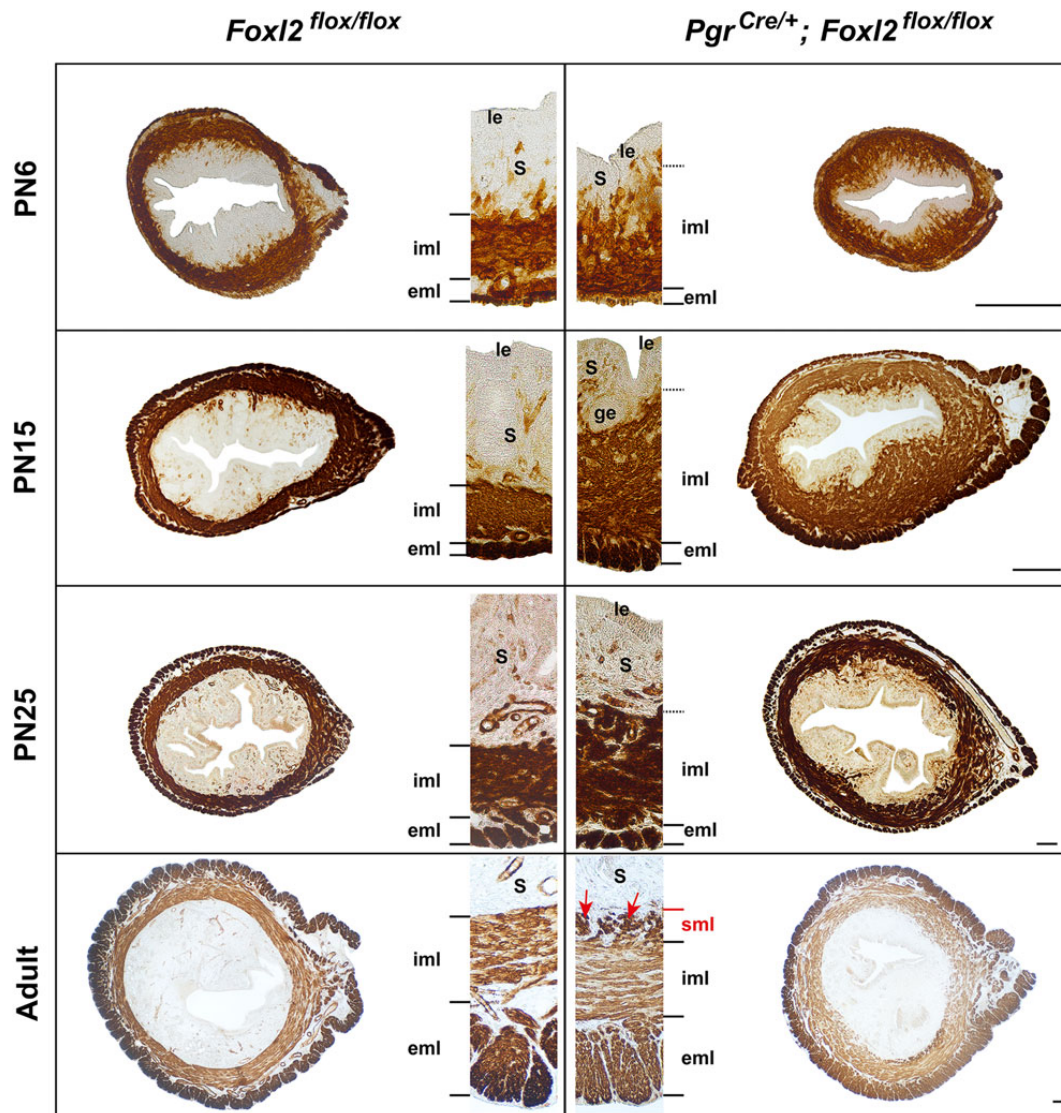


Figure 4. Altered uterine architecture in the absence of Foxl2. SMA α -stained sections of uteri from *Pgr*^{Cre/+}; *Foxl2*^{flox/flox} (left) and in *Pgr*^{Cre/+}; *Foxl2*^{flox/flox} (right) mice of different ages (PN6, PN15, PN25, Adult). In *Pgr*^{Cre/+}; *Foxl2*^{flox/flox} mice at PN6, PN15 and PN25 the thickness of the stroma (s) is reduced while the inner myometrial layer is increased. At PN6 and PN15 the border between the stroma and the IML is not clearly delimited and disorganized. In the adult, a supplementary myometrial layer with a longitudinal orientation (red arrows) is present between the stroma and the circularly oriented iml myofibres. Vascular smooth muscle cells are absent in stroma in *Pgr*^{Cre/+}; *Foxl2*^{flox/flox} uteri. eml: external myometrial layer, iml: inner myometrial layer, le: luminal epithelium, s: stroma, sml: supplementary myometrial layer, Scale bar: 100 μ m.

myometrial disorganization and vascular defects. *Pgr*^{Cre/+}; *Foxl2*^{flox/flox} mice present an enlarged and disordered myometrial layer, suggesting a defect of myometrial differentiation. In adult *Pgr*^{Cre/+}; *Foxl2*^{flox/flox} uteri, a supplementary layer of the myometrium is present at the myometrium/stroma border and VSMCs surrounding stromal arteries are absent. It has been shown that early stroma mesenchymal cells are progenitors of both the mature stroma and the myometrium (9).

Wnt pathway deregulation in the absence of Foxl2

Several members of the Wnt family are deregulated in *Pgr*^{Cre/+}; *Foxl2*^{flox/flox} uteri (Fig. 7). In particular, the expression of *Wnt5a*, *Wnt11* and *Wnt16* is significantly reduced while *Wnt4* and *Wnt7a* are up-regulated during uterine maturation. Wnt genes are key modulators of the epithelial-mesenchymal interactions essential for pre- and PN development of the uterus (7,33).

Wnt7a and *Wnt11* are expressed by the uterine epithelium; *Wnt4*, *Wnt5a* and *Wnt16* by the stroma. *Wnt5a*, *Wnt7a*, *Wnt11* and their downstream partners and targets (e.g. APC, β -catenin, Vangl-2) are involved in myometrial development and/or adenogenesis (7,34–36). Myometrial defects were also observed by employing models to induce or inhibit Wnt/ β catenine signalling in utero. The *Wnt7a*^{-/-} mice exhibit an hyperplastic myometrial layer (31). Interestingly, the myometrial phenotype is not present in *Pgr*^{Cre/+}; *Wnt7a*^{flox/flox} conditional mutants (31,32); this suggests that the epithelial Wnt7a-dependent signal controlling myogenesis precedes PGR-cre activation which begins at PN3. The myometrial phenotype of *Pgr*^{Cre/+}; *Foxl2*^{flox/flox} uteri is reminiscent of that of *Wnt7a*^{-/-} mutants; however, uterine-specific deletion of Foxl2 results in *Wnt7a* up regulation. These findings suggest the existence of regulation loop between the Foxl2-positive stroma and the Wnt7a-positive LE (Fig. 7): deletion of Foxl2 in the stroma would derepress Wnt7a in the epithelium which, in

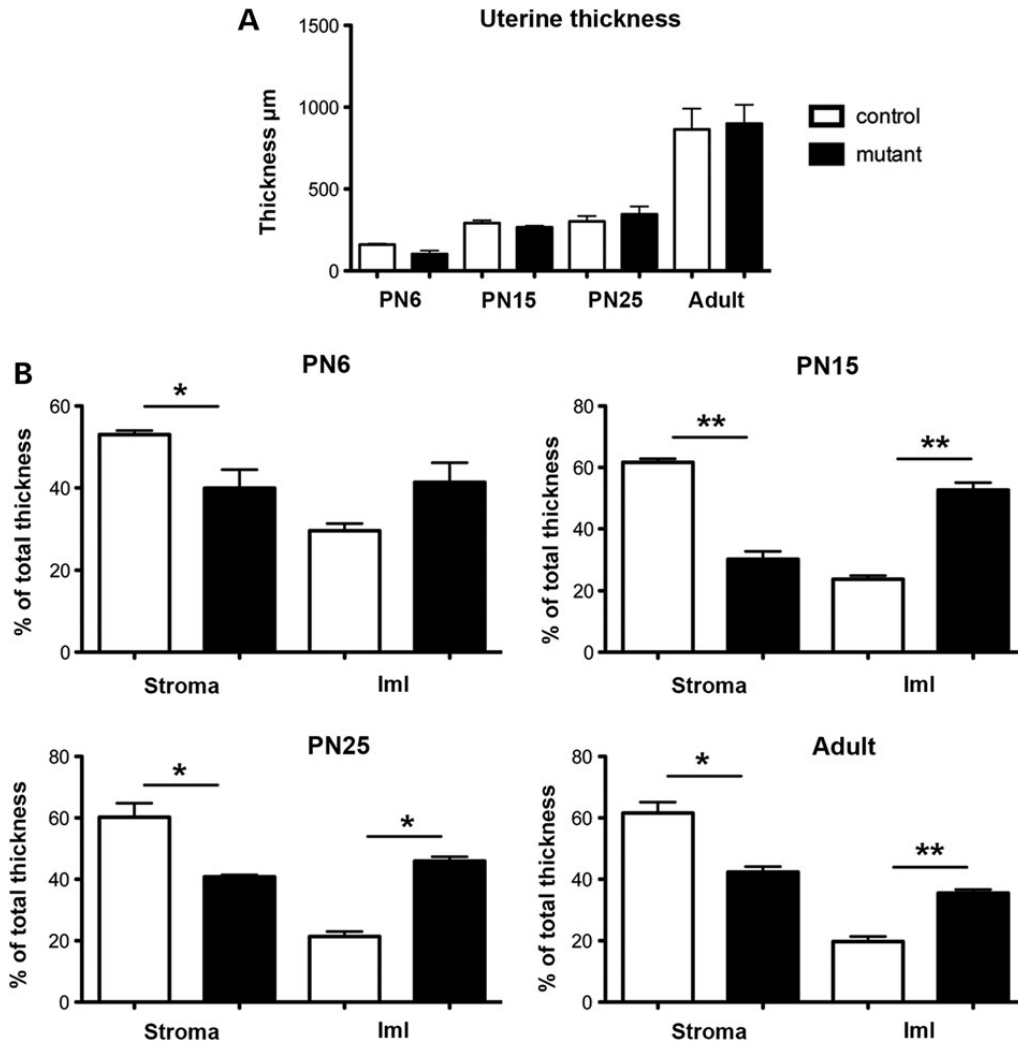


Figure 5. Quantitative analysis of uterine thickness. (A) Total uterine thickness (μm) in $Pgr^{cre/+}; Foxl2^{flox/flox}$ and control mice during PN maturation (PN6, PN15 and PN25) and in the adult. (B) Proportion of uterine thickness occupied by the stroma and by the inner myometrial layer in $Pgr^{cre/+}; Foxl2^{flox/flox}$ and control mice during PN maturation (PN6, PN15, PN25) and in the adult quantified on SMA α -stained slices. ImI, inner myometrial layer; * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.005$, Mann and Whitney t-test analysis.

turn, would not be able to induce a response of the *Foxl2*-negative stroma.

During early PN maturation, expression of *Wnt7a* in the LE is required for the maintenance of high levels of *Wnt4*, *Wnt5a*, *Hoxa10* and *Hoxa11* in the mesenchyme, which, in turn induces the differentiation of the mesenchyme into endometrium or myometrium (37). The strong deregulation of stroma-specific Wnts (*Wnt4*, *Wnt5a* and *Wnt16*) observed in $Pgr^{cre/+}; Foxl2^{flox/flox}$ uteri could result from a *Foxl2*-dependent regulation in mesenchymal cells.

Wnt signalling acts either through the canonical β -catenin/APC-complex pathway or through other non-canonical pathways. Interestingly targeted inhibition of the canonical Wnt pathway in the uterus result in myometrial defects confirming the importance of Wnt signalling for uterine maturation. Mesenchyme-specific deletion of APC or β -catenin in $Amhr2^{Cre/+}; APC^{flox/flox}$ and $Amhr2^{Cre/+}; \beta$ -catenin $^{flox/flox}$ present a disorganized myometrium. In $Amhr2^{Cre/+}; APC^{flox/flox}$ mice the myometrium is discontinuous, while in $Amhr2^{Cre/+}; \beta$ -catenin $^{flox/flox}$ mice the myometrium presents nodules which are then replaced by adipocytes (34,38,39). A phenotype reminiscent of the *Wnt7a* $^{-/-}$ myometrial hypertrophy was seen in *Vangl2* $^{-/-}$ mice (33,36).

A possible model to explain our findings would involve a *Foxl2*-dependent regulation of *Wnt7a* in the epithelium, which, in turn, would affect other Wnt genes in the stroma via *Vangl2*. *Foxl2* seems to participate in the establishment of the mesenchymal response to *Wnt7a* ultimately determining the differentiation-balance between SC and the cellular muscular layer (CML). *Foxl2* inactivation in the uterus would thus result in muscular hypertrophy through the deregulation of the *Wnt7a* signalling pathways in favour of CML.

The reduction of *Wnt5a* expression in our mutants might explain their reduced fertility. Indeed, a recent study shows that *Wnt5a* is important for uterine crypt formation and embryo implantation through non-canonical ROR signalling (40). Indeed, *Wnt5a* seems important to position blastocysts along the anti-mesometrial pole and to permit attachment and implantation.

Vascular defects in $Pgr^{cre/+}; Foxl2^{flox/flox}$ uteri

As demonstrated in Figure 6B and Supplementary Material, Fig. S3, some *Foxl2*-positive stroma cells give rise to VSMCs surrounding arteries of the uterus. In the absence of *Foxl2* these

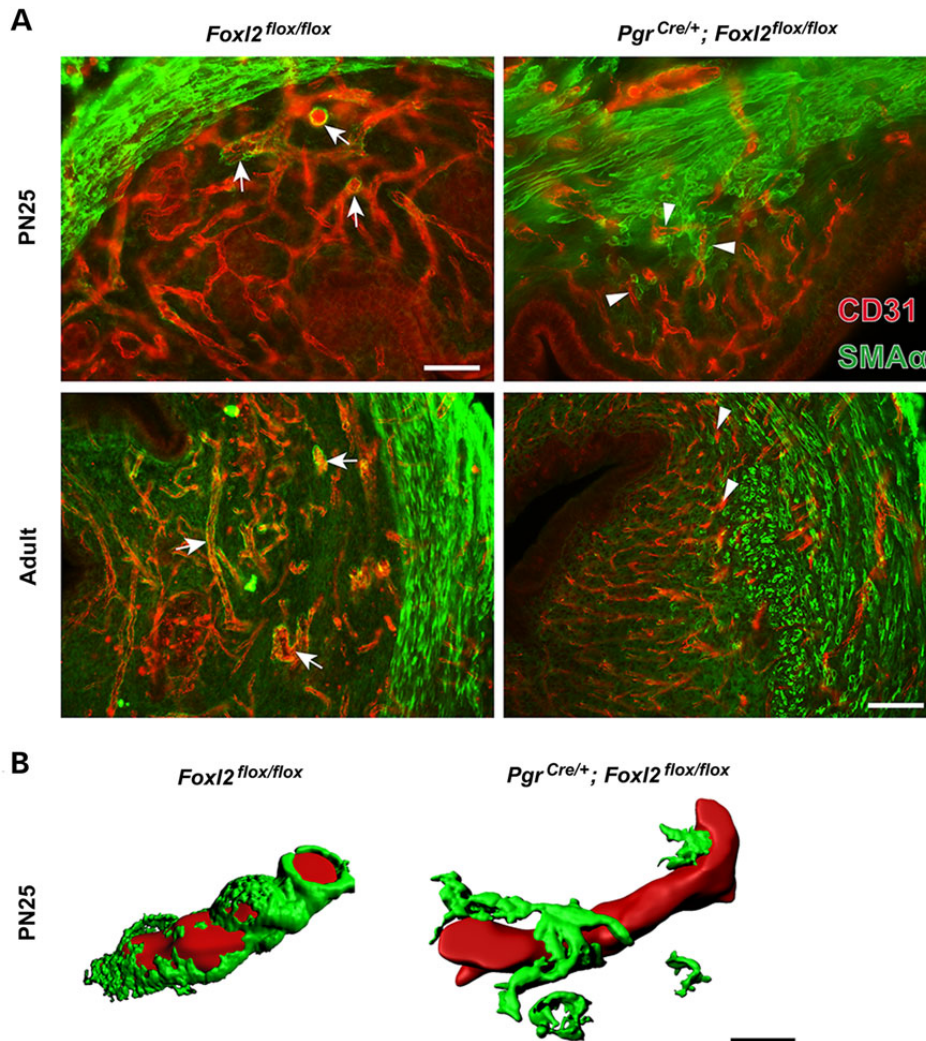


Figure 6. Uterine vascular defects resulting from *Foxl2* inactivation. (A) Double IHC for *SMAα* (green) and *CD31* (red) on uteri from *Pgr^{Cre/+}; Foxl2^{flox/flox}* (left) and *Pgr^{Cre/+}; Foxl2^{flox/flox}* (right) at PN25 and in the adult. Arrows indicate vessels in which the *CD31*-positive endothelium is in close association with the *SMAα*-positive VSMCs (see also B, left). Arrowheads indicate *CD31*-positive vessels in proximity, but not in close association, with *SMAα*-positive cells. (B) 3D reconstruction of confocal acquisitions of a representative vascular segments from *Pgr^{Cre/+}; Foxl2^{flox/flox}* (left) and in *Pgr^{Cre/+}; Foxl2^{flox/flox}* (right) at PN25. Scale bar: 100 μ m in PN25, 200 μ m in Adult, in A; 10 μ m in B.

precursors do not generate a normal vascular smooth muscular layer around blood vessels. *Foxl2* could act as a regulator of the global organization of myogenic cells through the deregulation of cell adhesion. Adhesion defects might also contribute to the myometrial disorganization described above. The effect of *Foxl2* on the formation of a coherent vascular smooth muscle layer could be much more general and not only limited to the uterus, for example we have observed the activation of *Foxl2* also in cephalic vasculature (15).

Implications for human pathology

In the human uterus the IML corresponds to the region also called JZ in MRI imaging. The JZ represents the inner third of the myometrium; together with its overlying endometrium, this region plays a critical role in placentation (41). There is no sharp anatomical demarcation between the JZ and the surrounding uterus, however its specific functional and pathological characteristics granted the use of this term to describe the maternal part of the utero-placental unit.

The JZ is responsible for uterine contractions throughout the menstrual cycle and is involved in, sperm transport, menses clearance and trophoblast invasion during placentation (42). An enlarged JZ has been observed in patients with recurrent miscarriage (43,44), with pelvic endometriosis (45) and adenomyosis, characterized by a benign invasion of the myometrium by the endometrium (46,47). Recently, MRI and vaginal sonography have highlighted anatomical defects in the myometrium in adenomyosis and endometriosis in women. Instead of smooth muscle changes representing a response to invading endometrial tissue, this imaging data have suggested that the primary defect in these conditions was myometrial dysfunction (48,49). These observations seem to indicate that disruption of the normal inner myometrial architecture due to excessive myocyte proliferation is a cause of diffuse adenomyosis rather than a consequence of it (48). Interestingly, mice treated with either tamoxifen present an adenomyosis-like phenotype with disorganized concentric and longitudinal smooth muscle layers (50) similar to those obtained after *Foxl2* inactivation. In human adenomyosis, β -catenin expression is higher in glandular epithelial

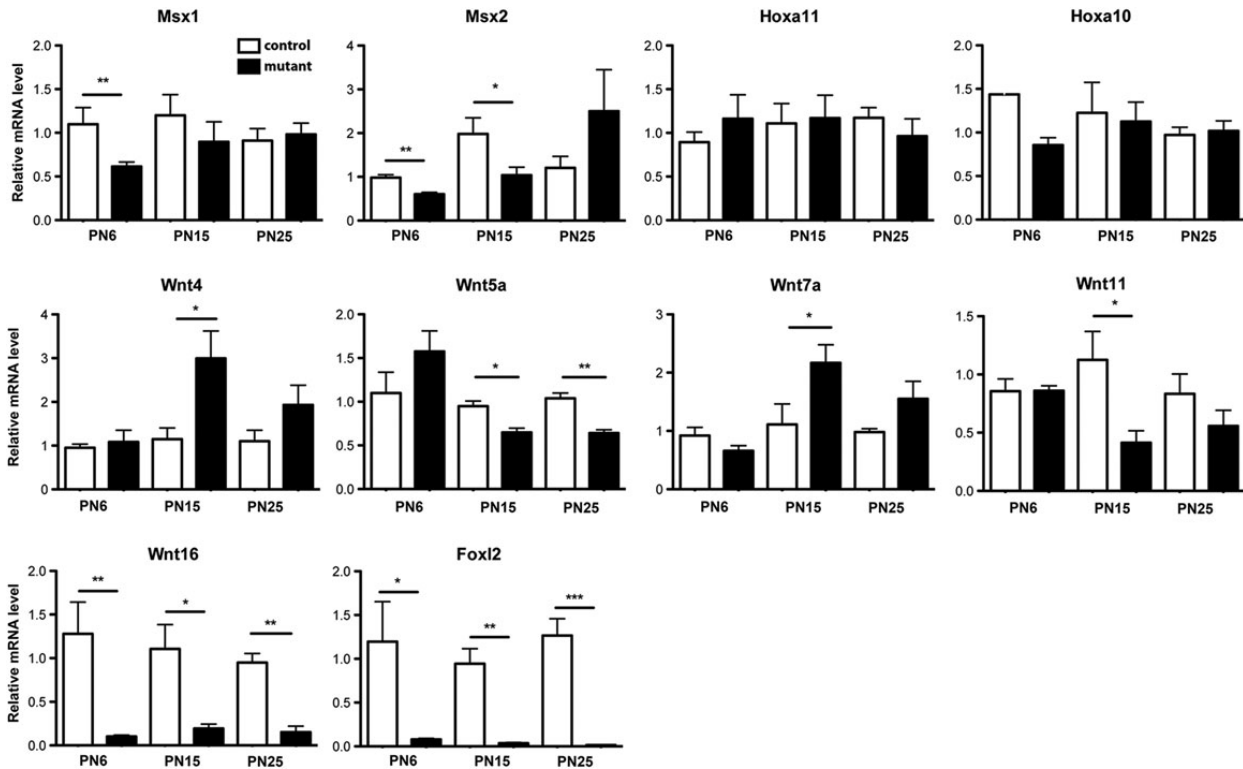


Figure 7. Effect of *Foxl2* inactivation on the expression of key genes of uterine maturation. Relative mRNA expression of gene implicated in PN development of uterus from PN25 *Foxl2^{lox/lox}* and in *Pgr^{cre/+}; Foxl2^{lox/lox}* mice. Control gene: *Sdha*. * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, Mann and Whitney test analysis.

cells; in the mouse, constitutive activation of the β -catenin pathway results in an adenomyosis-like phenotype (51) suggesting a link to the canonical Wnt pathway.

It appears that the JZ constitutes one of the primary sites of vascular pathology in pregnancies. It has been shown that a thick JZ is associated with repeated implantation failures in *in vitro* fertilization procedures, indicating that the JZ may be an important predictive factor for implantation and suggesting MRI for patients with consecutive implantation failures (44,52).

There is no specific study on the uterine function of BPES women, but spontaneous pregnancy leading to delivery have been reported. BPES type II female patients are usually considered to be fertile. However, several observations indicate that menstrual abnormalities and/or reduced fertility are associated with BPES type II, suggesting a partial phenotypic overlap between BPES type I and type II (11,53,54). One should not forget that in women, heterozygous loss of *FOXL2* might result in a milder uterine phenotype than that observed in homozygous mice. In view of these observations, our finding of a disorganized IML in *Pgr^{cre/+}; Foxl2^{lox/lox}* uteri could well be at the origin of abnormal uterine function and contribute to a better understanding of human subfertility.

Materials and Methods

Mice

Procedures involving animals were conducted in accordance with the directives of the European Community (council directive 86/609) and the French Agriculture Ministry (council directive 87-848, 19 October 1987, permissions 00782 to GL). Mice were housed

in specific pathogen-free and light, temperature (21°C) and humidity (50–60% relative humidity) controlled conditions. Food and water were available ad libitum. *Foxl2* expression pattern was studied using a knockin *Foxl2^{LacZ/+}* strain (12). We also used *Foxl2^{Cre/+}*, bred with *Rosa26^{lox-stop-lox-LacZ/+}* (referred to as *R26R^{LacZ/+}*) (55) mice to study the lineage of *Foxl2* expressing cells. *Pgr* Cre mice were provided by John P. Lydon and Francesco De Mayo Houston TX (26). Cre expressing strains were used to induce cell population-specific *Foxl2* inactivation when bred with a *Foxl2^{lox/lox}* mice strain (14). To obtain *Foxl2^{Pgr^{cre/+}; Foxl2^{lox/lox}}* we crossbred *Pgr^{cre/+}; Foxl2^{lox/+}* males with *Pgr^{+/+}; Foxl2^{lox/lox}* females. To obtain *Foxl2^{LacZ/+}* mice we crossbred *Foxl2^{LacZ/+}* males with B6D2F1N females. To obtain *Foxl2^{cre/+}; R26R^{LacZ/+}* mice we crossbred *R26R^{LacZ/LacZ}* males with *Foxl2^{cre/+}* females. Animals were backcrossed with wild-type B6D2F1/N from Charles River Laboratory (Italy).

Genotyping mice

For genotyping, DNA was extracted from mice tails and uteri using “KAPA express” extraction kit (Kapa Biosystems). Mutant mice were genotyped by PCR using allele-specific primers using TAKARA Ex Taq (Takara) or KAPA2G Fast Genotyping PCR mix (Kapa Biosystems):

- *Foxl2-lacZ*: 1. wild-type (WT) allele 1: 5'-CAGATGATGGC CAGTACCCCGAGC-3' and 2. wild-type (WT) allele 2: 5'-GTTGTGGCGGATGCTATTCTGCCAGCC-3'; mutant allele: 5'-GTAGATGGGCGCATCGTAACCGTGC-3'. PCR product of 500 bp shows *LacZ* type allele and 300 bp shows WT allele.
- *Foxl2-floxed-delta*: 1. Exon_Foxl2.fw: 5'-GGACAGCTTCTGG ATGCAGAGCC-3', 2. Upstream_Foxl2.fw: 5'-GCACACTTG

CGCAGTATCACGTGT-3', 3. Downstream_Foxl2.rv: 5'-CA GCGGAGCGACAAAAGCGGAGTCGCAGG-3'. PCR product of 100 bp shows wild-type allele, 200 bp product shows floxed allele and a 500 bp product shows the recombinant Δ allele.

- PGR-Cre and Foxl2-Cre mice: 1. Cre-L1: 5'-GCCACCAGCC AGCTATCAACTC-3', 2. Cre-R1: 5'-TTGCCCTGTTTCACT ATCCAG-3'. PCR product of 250 bp shows cre-recombinase gene.
- R26R mice: 1. Z1: 5'-GCGTTACCAACTTAATCG-3', 2. Z2: 5'-TGTGAGCGAGTA ACAACC-3', a PCR product of 350 bp shows LacZ allele.

Fertility test

For testing fertility, a total of 75 sexually mature female mice (2-month to 1-year-old) were bred with WT males (B6D2F1N) for up to 6 months, and vaginal plugs were detected. The litter size per mice during this period was recorded for each genotype. The duration of oestrous cycles was determined in female mice by daily analysis of the vaginal smears for a period of 4 weeks (56). For implantation studies, mice were sacrificed at 5.5 dpc and the number of implantation sites was recorded (57).

Histological analysis

Tissue samples and treatment

Uteri were dissected in Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma, France). Pictures of whole uteri were taken, and each uterine horn was measured for width (at two sites), length and area. Uteri were fixed in 4% paraformaldehyde for 1 day at 4°C or in Bouin's fixative solution (75% saturated picric acid, 20% formol 40%, 5% acetic acid) for 7 days at 4°C. Fixed uteri were embedded in paraffin and 8- μ m-thick sections were prepared. For cryostat sections tissues were cryoprotected in 4% paraformaldehyde with 15% sucrose for 1 day, then in sucrose 30% for 1 day and stored at -80°C. Cryoprotected uteri were embedded in OCT (Leica, France) and 12- μ m-thick sections were prepared. Uterine sections were stained by Mallory Trichromic (58) (Groat's hematoxylin, acid fuchsin, aniline blue/orange G or by hematoxylin and eosine).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on deparaffinized sections using standard protocols of the Dako Envision kit or the Dako ARK kit (DAKO, France). Anti-FOXL2 polyclonal rabbit primary antibody (22) was used at 1/200 dilution; the monoclonal mouse primary antibody for anti-SMA α (Sigma, France) was used at 1/2000 and the polyclonal rabbit primary antibody for anti-CD31 (Abcam, France) at 1/50. All primary antibodies were diluted in PBS with various Fetal Calf Serum (FCS) concentrations from 1 to 10%. The optimal FCS concentration was determined in calibration experiments.

For fluorescent IHC, we used floating sections of 50 μ m and the same primary antibody concentration was applied; secondary antibodies were Alexa Fluor 488 and/or Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit and/or goat anti-mouse (Invitrogen, France).

In situ hybridization

Foxl2 expression was analysed by in situ hybridization on 50 μ m floating sections using digoxigenin (DIG)-UTP labelled antisense RNA probes against Foxl2 mRNA (59). After hybridization, probes

were detected using an alkaline-phosphatase-conjugated anti-DIG antibody and BM Purple substrate (Roche).

Uterine layer measurement

Uterine layers were measured on sections after staining with anti-SMA α antibodies. For each uterus, the thickness of each layer was measured on five coronal sections distributed along uteri deriving from five different animals for each genotype and age (total $n = 25$ measures/genotype, age). Using the FIJI software, radiuses were drawn from the centre of the uterus and the thickness of the different layers (LE, Stroma, IML and EML) was measured.

qPCR

Total RNA was isolated from uterine samples using an RNeasy minikit (Qiagen) according to the manufacturer instructions. On-column deoxyribonuclease (Qiagen) digestion was incorporated into an RNA isolation procedure to remove potential genomic DNA contamination. RNA concentration and the ratio of the absorbance at 260 and 280 nm were measured using a Nano-Drop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Reverse transcription was carried out using 600 or 200 ng total RNA and Superscript III (Invitrogen) or Primscript (Ozyme) reverse transcriptase to obtain cDNA. Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystem). The PCR programme consisted of 95°C for 10 min, 40 cycles 95°C of 15 s, 60°C for 10 min. Relative gene expression was measured with Taqman gene expression assays (Life Technologies, France). All primers were Taqman pre-designed primers (Life Technologies). To measure the relative amount of PCR products, the Ct of Sdha was used as a control gene, was subtracted from the Ct of genes of interest to derive Δ Ct. The Δ Ct of mutant animals was compared with Δ Ct of control animals and the difference was assigned as $\Delta\Delta$ Ct. The fold change between two samples was then calculated as $2^{-\Delta\Delta$ Ct}.

Statistical analysis

The Mann-Whitney unpaired test was conducted using Prism (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA) to calculate the differences between groups. All values are expressed as means \pm SEM of combined data from replicate experiments. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Supplementary Material

Supplementary Material is available at HMG online.

Acknowledgements

B.B. is recipient of a doctoral fellowship from the IDEAL European Consortium. We are grateful to Dr D Lydon (Houston, TX, USA) for the kind gift of PGR-cre mice. We thank Aurélie Hagneau and Ocilia Fernandes, for technical assistance; Vincent Contremoulins of the ImagoSeine Plateform for confocal analysis and 3D reconstruction. We are obliged to Drs Nicolas Narboux-Nême and Yorick Gittton for interesting discussions and constructive criticism. A particular thank for the team in charge of mouse animal care and in particular Mr Stéphane Sosinsky and Mr Fabien Uridat.

Conflict of Interest statement. The authors have no financial interests or conflict of interest to disclose.

Funding

This research was partially supported by the EU Consortia IDEAL (HEALTH-F2-2011-259679) and HUMAN (EU-FP7-HEALTH-602757).

References

- Kobayashi, A. and Behringer, R.R. (2003) Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 969–980.
- Cha, J., Sun, X. and Dey, S.K. (2012) Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat. Med.*, **18**, 1754–1767.
- Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F. and Abbondanzo, S.J. (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, **359**, 76–79.
- King, A., Hiby, S.E., Gardner, L., Joseph, S., Bowen, J.M., Verma, S., Burrows, T.D. and Loke, Y.W. (2000) Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors—a review. *Placenta*, **21**(Suppl A), S81–S85.
- Wang, H. and Dey, S.K. (2006) Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat. Rev. Genet.*, **7**, 185–199.
- Aguilar, H.N. and Mitchell, B.F. (2010) Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Hum. Reprod. Update*, **16**, 725–744.
- Spencer, T.E., Hayashi, K., Hu, J. and Carpenter, K.D. (2005) Comparative developmental biology of the mammalian uterus. *Curr. Top. Dev. Bio.*, **68**, 85–122.
- Gray, C.A., Bartol, F.F., Tarleton, B.J., Wiley, A.A., Johnson, G.A., Bazer, F.W. and Spencer, T.E. (2001) Developmental biology of uterine glands. *Biol. Reprod.*, **65**, 1311–1323.
- Brody, J.R. and Cunha, G.R. (1989) Histologic, morphometric, and immunocytochemical analysis of myometrial development in rats and mice: I. Normal development. *Amer. J. Anat.*, **186**, 1–20.
- Baron, D., Batista, F., Chaffaux, S., Cocquet, J., Cotinot, C., Cribiu, E., De Baere, E., Guiguen, Y., Jaubert, F., Pailhoux, E. et al. (2005) Foxl2 gene and the development of the ovary: a story about goat, mouse, fish and woman. *Reprod. Nutr. Dev.*, **45**, 377–382.
- 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. *Nat. Genet.*, **27**, 159–166.
- Schmidt, D., Ovitt, C.E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A.C. and Treier, M. (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*, **131**, 933–942.
- Uda, M., Ottolenghi, C., Crisponi, L., Garcia, J.E., 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. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 1171–1181.
- Uhlenhaut, N.H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A.C., Klugmann, C., Klasen, C., Holter, N. I. et al. (2009) Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, **139**, 1130–1142.
- Heude, E., Bellessort, B., Fontaine, A., Hamazaki, M., Treier, A.C., Treier, M., Levi, G. and Narboux-Neme, N. (2014) Etiology of craniofacial malformations in mouse models of blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 1670–1681.
- 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. *Mol. Endocrinol.*, **24**, 1024–1036.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 3330–3335.
- Pisarska, M.D., Bae, J., Klein, C. and Hsueh, A.J. (2004) Forkhead I2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. *Endocrinology*, **145**, 3424–3433.
- Pannetier, M., Fabre, S., Batista, F., Kocer, A., Renault, L., Jolivet, G., Mandon-Pepin, 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. *J. Mol. Endocrinol.*, **36**, 399–413.
- Cocquet, J., Pailhoux, E., Jaubert, F., Servel, N., Xia, X., Pannetier, M., De Baere, E., Messiaen, L., Cotinot, C., Fellous, M. et al. (2002) Evolution and expression of FOXL2. *J. Med. Genet.*, **39**, 916–921.
- 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. et al. (2006) Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology*, **147**, 1097–1121.
- Eozenou, C., Vitorino Carvalho, A., 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. *Biol. Reprod.*, **87**, 32.
- Governini, L., Carrarelli, P., Rocha, A.L., Leo, V.D., Luddi, A., Arcuri, F., Piomboni, P., Chapron, C., Bilezikjian, L.M. and Petraglia, F. (2014) FOXL2 in human endometrium: hyperexpressed in endometriosis. *Reprod. Sci.*, **21**, 1249–1255.
- Tran, S., Zhou, X., Lafleur, C., Calderon, M.J., Ellsworth, B.S., Kimmins, S., Boehm, U., Treier, M., Boerboom, D. and Bernard, D.J. (2013) Impaired fertility and FSH synthesis in gonadotrope-specific Foxl2 knockout mice. *Mol. Endocrinol.*, **27**, 407–421.
- Teixeira, I., Rueda, B.R. and Pru, J.K. (2008) In *StemBook*. Harvard Stem Cell Institute, Cambridge, MA.
- Soyal, S.M., Mukherjee, A., Lee, K.Y., Li, J., Li, H., DeMayo, F.J. and Lydon, J.P. (2005) Cre-mediated recombination in cell lineages that express the progesterone receptor. *Genesis*, **41**, 58–66.
- Franco, H.L., Jeong, J.W., Tsai, S.Y., Lydon, J.P. and DeMayo, F.J. (2008) In vivo analysis of progesterone receptor action in the uterus during embryo implantation. *Sem. Cell Dev. Biol.*, **19**, 178–186.
- Gava, N., Clarke, C.L., Byth, K., Arnett-Mansfield, R.L. and DeFazio, A. (2004) Expression of progesterone receptors A and B in the mouse ovary during the estrous cycle. *Endocrinology*, **145**, 3487–3494.
- Ellsworth, B.S., Egashira, N., Haller, J.L., Butts, D.L., Cocquet, J., Clay, C.M., Osamura, R.Y. and Camper, S.A. (2006) FOXL2 in the pituitary: molecular, genetic, and developmental analysis. *Mol. Endocrinol.*, **20**, 2796–2805.
- Ismail, P.M., Li, J., DeMayo, F.J., O'Malley, B.W. and Lydon, J.P. (2002) A novel LacZ reporter mouse reveals complex regulation of the progesterone receptor promoter during mammary gland development. *Mol. Endocrinol.*, **16**, 2475–2489.

31. Miller, C., Degenhardt, K. and Sassoon, D.A. (1998) Fetal exposure to DES results in de-regulation of Wnt7a during uterine morphogenesis. *Nat. Genet.*, **20**, 228–230.
32. Dunlap, K.A., Filant, J., Hayashi, K., Rucker, E.B. 3rd, Song, G., Deng, J.M., Behringer, R.R., DeMayo, F.J., Lydon, J., Jeong, J.W. et al. (2011) Postnatal deletion of Wnt7a inhibits uterine gland morphogenesis and compromises adult fertility in mice. *Biol. Reprod.*, **85**, 386–396.
33. Hayashi, K., Yoshioka, S., Reardon, S.N., Rucker, E.B. 3rd, Spencer, T.E., DeMayo, F.J., Lydon, J.P. and MacLean, J.A. 2nd. (2011) WNTs in the neonatal mouse uterus: potential regulation of endometrial gland development. *Biol. Reprod.*, **84**, 308–319.
34. Tanwar, P.S., Lee, H.J., Zhang, L., Zukerberg, L.R., Taketo, M.M., Rueda, B.R. and Teixeira, J.M. (2009) Constitutive activation of Beta-catenin in uterine stroma and smooth muscle leads to the development of mesenchymal tumors in mice. *Biol. Reprod.*, **81**, 545–552.
35. Tanwar, P.S., Zhang, L., Roberts, D.J. and Teixeira, J.M. (2011) Stromal deletion of the APC tumor suppressor in mice triggers development of endometrial cancer. *Cancer Res.*, **71**, 1584–1596.
36. Vandenberg, A.L. and Sassoon, D.A. (2009) Non-canonical Wnt signaling regulates cell polarity in female reproductive tract development via van gogh-like 2. *Development*, **136**, 1559–1570.
37. Mericskay, M., Kitajewski, J. and Sassoon, D. (2004) Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. *Development*, **131**, 2061–2072.
38. Arango, N.A., Szotek, P.P., Manganaro, T.F., Oliva, E., Donahoe, P.K. and Teixeira, J. (2005) Conditional deletion of beta-catenin in the mesenchyme of the developing mouse uterus results in a switch to adipogenesis in the myometrium. *Dev. Biol.*, **288**, 276–283.
39. Wang, Y., Jia, Y., Franken, P., Smits, R., Ewing, P.C., Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Burger, C.W., Anton Grootegoed, J., Fodde, R. et al. (2011) Loss of APC function in mesenchymal cells surrounding the Mullerian duct leads to myometrial defects in adult mice. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **341**, 48–54.
40. Cha, J., Bartos, A., Park, C., Sun, X., Li, Y., Cha, S.W., Ajima, R., Ho, H.Y., Yamaguchi, T.P. and Dey, S.K. (2014) Appropriate crypt formation in the uterus for embryo homing and implantation requires Wnt5a-ROR signaling. *Cell Rep.*, **8**, 382–392.
41. Brosens, I., Derwig, I., Brosens, J., Fusi, L., Benagiano, G. and Pijnenborg, R. (2010) The enigmatic uterine junctional zone: the missing link between reproductive disorders and major obstetrical disorders? *Hum. Reprod.*, **25**, 569–574.
42. Brosens, J.J., de Souza, N.M. and Barker, F.G. (1995) Uterine junctional zone: function and disease. *Lancet*, **346**, 558–560.
43. Lazzarin, N., Exacoustos, C., Vaquero, E., De Felice, G., Manfellotto, D. and Zupi, E. (2014) Uterine junctional zone at three-dimensional transvaginal ultrasonography in patients with recurrent miscarriage: a new diagnostic tool? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **174**, 128–132.
44. Piver, P. (2005) [Uterine factors limiting ART coverage]. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, **34**, 5S30–5S33.
45. Exacoustos, C., Luciano, D., Corbett, B., De Felice, G., Di Felicianantonio, M., Luciano, A. and Zupi, E. (2013) The uterine junctional zone: a 3-dimensional ultrasound study of patients with endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **209**, 248.e1–e7.
46. Larsen, S.B., Lundorf, E., Forman, A. and Dueholm, M. (2011) Adenomyosis and junctional zone changes in patients with endometriosis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **157**, 206–211.
47. Bird, C.C., McElin, T.W. and Manalo-Estrella, P. (1972) The elusive adenomyosis of the uterus—revisited. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **112**, 583–593.
48. Brosens, J.J., Barker, F.G. and de Souza, N.M. (1998) Myometrial zonal differentiation and uterine junctional zone hyperplasia in the non-pregnant uterus. *Hum. Reprod. Update*, **4**, 496–502.
49. Kunz, G., Beil, D., Huppert, P. and Leyendecker, G. (2000) Structural abnormalities of the uterine wall in women with endometriosis and infertility visualized by vaginal sonography and magnetic resonance imaging. *Hum. Reprod.*, **15**, 76–82.
50. Parrott, E., Butterworth, M., Green, A., White, I.N. and Greaves, P. (2001) Adenomyosis—a result of disordered stromal differentiation. *Am. J. Pathol.*, **159**, 623–630.
51. Oh, S.J., Shin, J.H., Kim, T.H., Lee, H.S., Yoo, J.Y., Ahn, J.Y., Broaddus, R.R., Taketo, M.M., Lydon, J.P., Leach, R.E. et al. (2013) beta-Catenin activation contributes to the pathogenesis of adenomyosis through epithelial-mesenchymal transition. *J. Pathol.*, **231**, 210–222.
52. Tocci, A., Greco, E. and Ubaldi, F.M. (2008) Adenomyosis and ‘endometrial-subendometrial myometrium unit disruption disease’ are two different entities. *Reprod. Biomed. Online*, **17**, 281–291.
53. Fokstuen, S., Antonarakis, S.E. and Blouin, J.L. (2003) FOXL2-mutations in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome (BPES); challenges for genetic counseling in female patients. *Am. J. Med. Genet. A*, **117A**, 143–146.
54. Meduri, G., Bachelot, A., Duflos, C., Bstandig, B., Poirot, C., Genestie, C., Veitia, R., De Baere, E. and Touraine, P. (2010) FOXL2 mutations lead to different ovarian phenotypes in BPES patients: Case Report. *Hum. Reprod.*, **25**, 235–243.
55. Soriano, P. (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.*, **21**, 70–71.
56. Caligioni, C.S. (2009) Assessing reproductive status/stages in mice. *Current Protocols in Neuroscience*, Editorial Board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.], 48: Appendix 4I.1-Appendix 4I.8. Cellular and Developmental Neurobiology, NIH/NINDS, Bethesda Maryland © 2009 by John Wiley & Sons, Inc.
57. Deb, K., Reese, J. and Paria, B.C. (2006) Methodologies to study implantation in mice. *Methods Mol. Med.*, **121**, 9–34.
58. Sato, T., Kurihara, Y., Asai, R., Kawamura, Y., Tonami, K., Uchijima, Y., Heude, E., Ekker, M., Levi, G. and Kurihara, H. (2008) An endothelin-1 switch specifies maxillo-mandibular identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 18806–18811.
59. Bouhali, K., Dipietromaria, A., Fontaine, A., Caburet, S., Barbieri, O., Bellessort, B., Fellous, M., Veitia, R.A. and Levi, G. (2011) Allelic reduction of Dlx5 and Dlx6 results in early follicular depletion: a new mouse model of primary ovarian insufficiency. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 2642–2650.

4. RESUME DE L'ARTICLE 2

4.1. *Dlx5* et *Dlx6* s'expriment dans l'épithélium durant le développement et la maturation post-natale l'utérus

Dans cette étude, j'ai montré que *Dlx5* était exprimé à partir de E15.5 dans la partie médiane des canaux de Müller, qui est le futur utérus (Article2 Fig.1A). Son expression persiste durant toute l'embryogenèse et est localisée à E18.5 dans l'épithélium (Article2 Fig.1D, E, F). Pendant la maturation post-natale de l'utérus, *Dlx5* est exprimée par l'épithélium luminal qui forme progressivement les glandes utérines. A PN6, *Dlx5* est exprimé dans l'épithélium luminal et dans les bourgeonnements épithéliaux à l'origine des glandes (Article2 Fig. 2A). A PN8 et PN12, *Dlx5* est exprimé dans l'épithélium luminal et glandulaire en formation (Article2 Fig. 2C et C'). Dans l'utérus adulte, *Dlx5* et *Dlx6* sont exprimés dans tout l'épithélium (Article2 Fig. 2D, D', E, E' et F, F').

4.2. L'inactivation conditionnelle de *Dlx5* et *Dlx6* dans l'utérus provoque un défaut de formation des glandes utérines, associé à la présence d'invaginations anormales et à un changement de morphologie épithéliale.

Afin d'analyser le rôle de *Dlx5* et *Dlx6* durant la maturation post-natale de l'utérus, j'ai étudié l'inactivation de ces gènes de manière conditionnelle sur les souris *Pgr^{cre/+}; Dlx5/6^{flox/flox}*. Les souris adultes sont infertiles. L'absence de ces gènes dans l'utérus provoque une très forte réduction du nombre de glandes utérines (Article2 Fig. 4B) et la lumière possède une structure différente où l'on note la présence de nombreuses invaginations larges qui se retrouvent dans toute la longueur de l'utérus (Article2 Fig. 4A). De plus, l'épithélium luminal des mutants *Pgr^{cre/+}; Dlx5/6^{flox/flox}* devient cubique au lieu d'être colonnaire (Article2 Fig. 5D). Ces données montrent que la présence de *Dlx5* et *Dlx6* dans l'épithélium est nécessaire à l'organisation de la lumière et à la formation des GU. La forte réduction du nombre de GU et le changement de morphologie épithéliale pourraient expliquer l'infertilité de ces souris.

4.3. Inactivation conditionnelle de *Dlx5* et *Dlx6* dans l'utérus agit sur l'expression de gènes clés gouvernant la maturation utérine

Les utérus des souris *Pgr^{cre/+}; Dlx5/6^{flox/flox}* présentent des dérégulations de plusieurs gènes clés impliqués dans la maturation post-natale utérine (Article2 Fig. 6). En particulier certains gènes épithéliaux jouant un rôle clé dans la formation des glandes utérines, dont *Wnt7a*, qui

est augmenté et *Foxa2*, normalement exprimé par les GU, qui est sous exprimé. Ceci suggère que *Dlx5* et *Dlx6* agiraient sur la formation des glandes utérines par la régulation de ces gènes.

4.4. Analyse de l'expression de *DLX5* dans l'endométriase

Nous avons ensuite examiné l'expression de *DLX5* dans l'utérus humain normal et pathologique. Nous observons que, dans l'endométriase, des modifications de la morphologie épithéliale sont accompagnées par de profondes modifications du profil d'expression de *DLX5* (Article2 Fig. 7). Ces observations suggèrent que *DLX5* a un rôle dans la définition du statut de l'épithélium de l'endomètre, qui peut être dérégulé dans cette pathologie.

5. ARTICLE 2

Dlx5 and Dlx6 control adenogenesis during post-natal uterine maturation: implications for endometriosis

Brice Bellessort, Marine Le Cardinal, Anne Bachelot, Nicolas Narboux-Nême, Anastasia Fontaine, Gladys Alfama, and Giovanni Levi

Soumission prévue à Human Molecular Genetics

***Dlx5* and *Dlx6* control adenogenesis during post-natal uterine maturation:
implications for endometriosis**

Brice Bellessort, Marine Le Cardinal, Anne Bachelot, Nicolas Narboux-Nême, Anastasia Fontaine, Gladys Alfama, and Giovanni Levi*

Évolution des Régulations Endocriniennes, CNRS UMR 7221, Muséum Nationale d'Histoire Naturelle, Paris 75005, France

* To whom correspondence should be addressed:

Dr Giovanni Levi

CNRS UMR7221

Evolution des Régulations Endocriniennes

Muséum National d'Histoire Naturelle

7 rue Cuvier

75231 Paris Cedex 05

email: glevi@mnhn.fr

Tel : (33) 1 40793621

Fax : (33) 1 40793618

Key words : adenogenesis, uterus, *Dlx5*, *Dlx6*, post-natal maturation, reproductive health.

Abstract

Dlx5 and *Dlx6* encode for two homeodomain transcription factors which during development, play important roles in the control of morphogenesis and cell differentiation. Mutations in the *Dlx5/Dlx6* locus (7q21.3) are associated to the ectrodactyly Split Hand Foot Malformation type I, indeed, during limb development these genes are expressed by epithelial cells of the apical ectodermal ridge and determine appendage patterning.

Here we show that *Dlx5* and *Dlx6* are also expressed in the epithelium of Müllerian ducts from E15.5 and that their expression persists in the uterine luminal and glandular epithelia throughout postnatal maturation and in the adult. We have conditionally inactivated postnatally both *Dlx5* and *Dlx6* in the uterus using a *Pgr*^{cre/+} allele. Double-mutant females are sterile. The uteri of *Pgr*^{cre/+}; *Dlx5/6*^{flox/flox} mice present very few uterine glands while the uterine lumen is characterized by numerous abnormally large invaginations. In *Dlx5/6* mutant uteri the luminal epithelium is not columnar, but presents a cuboidal-like morphology. qPCR analysis of candidate genes shows that in *Dlx5/6* mutant uteri the expression of *Wnt7a*, which plays a role in gland formation, is increased while *Msx1*, which is involved in epithelial morphology change during implantation, is significantly reduced. Remarkably, the morphology of the mutant luminal epithelium closely-resembles that observed in ectopic human endometriotic lesions in which *Dlx5* expression is strongly reduced.

We conclude that *Dlx5* and *Dlx6* are involved in determining uterine epithelial architecture and in the generation of uterine glands; their expression might be, therefore, needed for embryo implantation.

INTRODUCTION

The histological organization of the adult uterine endometrium consists of a simple columnar luminal epithelium (LE) supported by stromal cells that contain tubular and coiled endometrial glands lined by glandular epithelium (GE) (1, 2). Circular and longitudinal layers of smooth muscle, termed the myometrium, surround the endometrium. Development of the uterus begins prenatally with formation, patterning, and then fusion of the Müllerian ducts (3) (4). Although the organogenetic development and differentiation of most female reproductive tract organs from the Müllerian ducts are complete at birth, the uterus is neither fully developed nor differentiated at birth. Establishment of tissue-specific uterine histoarchitecture is only completed postnatally in laboratory rodents, domestic animals, and humans (5).

At birth, the neonatal mouse uterus lacks endometrial glands and consists of a simple LE supported by relatively undifferentiated mesenchyme (2). Between birth (Postnatal Day [PN] 0) and PN3, the three layers of mesenchyme are distinctly segregated into radially oriented endometrial stroma and inner circular and prospective outer longitudinal myometrial layers. By PN6, epithelial invaginations appear that represent formation of GE buds (5). By PN12, endometrial glands extend from the LE into the surrounding endometrial stroma. The basic adult configuration of the uterus in mice is established by PN15 (5). Postnatal uterine morphogenesis is a critical period, because disruption of endometrial adenogenesis and mesenchymal specification and differentiation can cause permanent fertility problems in the adult (6, 7). Moreover, proper development of the endometrial stroma and myometrium is crucial for endometrial receptivity and decidualization as well as for expulsion of the fetus at term (8). During the preimplantation period of early pregnancy, endometrial glands synthesize and secrete several proteins required for the establishment of uterine receptivity and embryo implantation (9-12). Postnatal uterine morphogenesis is complex and governed by intrinsic stromal-epithelial interactions that are precisely orchestrated by multifactorial gene networks as well as endocrine hormones after puberty (13).

Dlx genes comprise a highly conserved family of homeobox genes homologous to the *Distal-less (Dll)* gene of *Drosophila*. During embryonic development, *Dlx* genes are expressed in craniofacial primordia, basal telencephalon and diencephalon, in the apical ectodermal ridge of the limb buds. Deletion of the coding and intergenic regions of *Dlx5* and *Dlx6* with a single

targeting event in the mouse results in perinatal death, limb malformations reminiscent of the human ectrodactyly, Split Hand Foot Malformation type I (SHFM1) and in the transformation of lower jaws into upper-like jaws (14-16). Besides these patterning defects, these same mutants have also permitted to identify the roles for *Dlx5* and *Dlx6* in the control of cell differentiation. In particular, *Dlx5/6* play a role in the control of bone development (17), in the differentiation of Leydig cells (18). In female physiology, *Dlx5* and *Dlx6* are expressed in granulosa cells of ovarian follicles and control follicular maturation and steroidogenesis. Heterozygous mutant females *Dlx5/6*^{+/-} have a reduced fertility due to rapid follicular depletion (19). Several studies have shown that DLX5 is also expressed in the human endometrium. Indeed, high-throughput profiling experiments have shown that, beside the ovary, *DLX5* and *DLX6* are also upregulated during the secretory phase in the human endometrium (20). In endometrial pathologies, several studies have shown deregulation of *DLX5* in comparison to healthy endometrium. For example in endometriosis, a condition characterized by the presence of uterine tissue outside the uterine cavity, *DLX5* is one of the most downregulated genes in endometriotic lesion compare to eutopic endometrium (21). Moreover, in endometroid adenocarcinomas, *DLX5* expression is upregulated (22, 23).

Here, we have analysed the function of *Dlx5* and *Dlx6* in the mouse uterus. Conditional inactivation of *Dlx5* and *Dlx6* in the uterus during post-natal maturation results in reduced adenogenesis and abnormal lumen architecture, with large number of wide invaginations that extended along the uterus. The LE morphology is impaired and appears cuboidal. We provide evidence of the fact that *DLX5* is also expressed by human uterine epithelia and that its expression is deregulated in certain forms of endometriosis suggesting that *DLX5* and *DLX6* could represent interesting targets to tackle this condition.

RESULTS

***Dlx5* expression during uterine development**

The distribution of *Dlx5* during uterine development was analysed in *Dlx5^{LacZ/+}* mice. At 15.5 days post coitum (dpc), just after sexual differentiation, *Dlx5* is expressed by the in the medial part of the Müllerian ducts, that correspond to the future uterus (Fig. 1A). At E16.5 and E18.5, *Dlx5* continue to be expressed in the Müllerian ducts, but also in the cervix (Fig. 1B, C). At E18.5 *Dlx5* expression is detectable in the uterine epithelium, as seen with *Dlx5^{LacZ/+}* mice (Fig. 1D, E) and by *in situ* hybridization (Fig. 1F).

***Dlx5* and *Dlx6* are expressed in luminal and glandular epithelia in the post-natal uterus**

During post-natal maturation of the uterus, *Dlx5* is expressed by the luminal epithelium that progressively forms uterine glands. At PN6, *Dlx5* is present in the luminal epithelium and in the forming epithelial buds (Fig. 2A'). At PN8, *Dlx5* is expressed in the first uterine glandular epithelium (Fig. 2B') and persists then (PN12) in luminal and glandular epithelium (Fig. 2C and C'). In the adult uterus, *Dlx5* is still expressed in the glandular epithelium and in some portion of the luminal epithelium (Fig. 2D and D'). *In situ* hybridization confirms that both *Dlx5* and *Dlx6* transcripts are present in all luminal and glandular epithelium (Fig. 2E, E' and F, F').

***Dlx5* and *Dlx6* conditional inactivation in the uterus**

We generated mice carrying an allele permitting the conditional inactivation of both *Dlx5* and *Dlx6* (*Dlx5/6^{lox/lox}*). We then crossed *Dlx5/6^{lox/lox}* mice with Progesterone receptor Cre knockin (*Pgr^{Cre/+}*) mice (24) to obtain conditional ablation of *Dlx5* and 6 in the uterus. The *Pgr* promoter is active from P3 in the uterine epithelium and from P6 in the uterine stroma (25). At this stage, *Pgr* is not expressed in the granulosa of immature follicles (24, 26). At P25, in *Pgr^{Cre/+}; Dlx5/6^{lox/lox}* the recombinant allele was present in the uterus but not in the tail (Fig 3B). qPCR analysis confirmed the absence of *Dlx5* and *Dlx6* transcripts from the uterus of *Pgr^{Cre/+}; Dlx5/6^{lox/lox}* mice (Fig. 3C).

***Pgr^{Cre}* driven *Dlx5/6* inactivation results in infertility**

Pgr^{Cre/+}; Dlx5/6^{lox/lox} females are not fertile. Ovaries of PN25 mutant and WT mice were similar, with the presence of all classes of follicles (Fig. 4). Despite these apparently normal

features, after crossing with WT males, adult $Pgr^{Cre/+}; Dlx5/6^{flox/flox}$ females never remained pregnant.

Conditional inactivation of *Dlx5/6* in the uterus results in abnormal luminal invaginations and reduced adenogenesis.

$Pgr^{Cre/+}; Dlx5/6^{flox/flox}$ females at PN25 present few uterine glands (Fig. 4 A, B). The number of uterine glands was significantly ($p = 0.0024$) lower in the mutant (1.681 ± 0.3064) than in controls (7.639 ± 1.328). We note that the $Pgr^{Cre/+}; Dlx5/6^{flox/flox}$ uteri present a higher number of large luminal invaginations than controls, which present a small lumen with thin invagination often terminated by uterine glands. To better analyse the morphology of the uterine lumen, we performed 3D segmentation of a uterine portion of a 512 μm length. 3D reconstruction of luminal shape shows a completely different structure of mutant luminal invaginations. In mutant $Pgr^{Cre/+}; Dlx5/6^{flox/flox}$ mice, invaginations are profound and continuous over a large portion along the uterus and often bifurcated at the end, on the contrary in control animals invaginations were present only punctually along the uterus (Fig. 4A).

***Dlx5/6* inactivation results in uterine luminal epithelium defects.**

The luminal epithelium of $Pgr^{Cre/+}; Dlx5/6^{flox/flox}$ uteri is abnormal. The simple columnar organization of the luminal epithelium in control uterus (Fig. 5C) appears more cuboidal in mutant $Pgr^{Cre/+}; Dlx5/6^{flox/flox}$ (Fig. 5D). In mutant LE, nuclei are round and localized in the center of the cell contrary to the basal pole localization observed in controls.

Effect of *Dlx5/6* inactivation on the expression of key genes of uterine maturation.

In $Pgr^{Cre/+}; Dlx5/6^{flox/flox}$ uteri, several key genes involved in uterine post-natal maturation were deregulated (Fig. 6). In the uterus, several *Wnt* genes are known to orchestrate post-natal maturation (4). In particular, *Wnt7a* plays a role in glandular and myometrial formation (30) and regulates other *Wnt* genes and *Hoxa10* and *Hoxa11* (Dunlap 2011), which play an important role in stromal proliferation. At PN25 *Wnt7a*, expressed in the luminal epithelium, and *Wnt11*, expressed in both glandular and luminal epithelium, are upregulated. *Msx1* and *Msx2*, are expressed by LE cells. In $Pgr^{Cre/+}; Dlx5/6^{flox/flox}$ uteri *Msx1* is downregulated while *Msx2* is upregulated. As expected, *Foxa2*, normally expressed by uterine GE is downregulated in mutant uteri. Surprisingly LIF, which is mostly produced by the uterine

glands, was upregulated. *Hoxa10* and *Hoxa11*, which are expressed in the stroma, are downregulated. As expected, in conditionally-deleted uteri, *Dlx5* and *Dlx6* expression is not detectable.

Altered expression of *Dlx5* in human endometriosis.

It has been previously shown by transcriptome analysis that *DLX5* is expressed in the human endometrium and that is the most downregulated gene in ectopic endometriotic lesions (21). As in the mouse, in the human endometrium, *DLX5* is present in the endometrial glandular epithelium. A strong homogenous signal is detected (Fig.7). In endometriotic tissues, the *DLX5* protein is not homogeneously distributed with segments of the epithelium *DLX5*-negative, and other *DLX5*-positive. Moreover, even *DLX5*-positive regions of the endometriotic epithelium present a weaker *DLX5* immunostain than control endometrium. As in *Pgr^{Cre/+};Dlx5/6^{flox/flox}* mice, the epithelium of endometriotic lesion was often cuboidal and abnormal when compared to eutopic uterine LE.

DISCUSSION

It has been previously shown that *Dlx5* and *Dlx6* are expressed at several levels of the female reproductive tract (FRT). Although their function in the ovary has been previously analysed in mutant mice (19), very few data were so far available on the distribution and function of *Dlx5/6* at other levels of the FRT. With this study we provide new insight to understand the physiological role of *Dlx5/6* in the postnatal uterus. We show that conditional inactivation of *Dlx5* and *Dlx6* during maturation of the mouse uterus results in reduced adenogenesis, abnormal lumen architecture and luminal epithelium morphology. We also show that DLX5 is expressed by human uterine luminal and glandular epithelium and that its deregulation is associated with endometriosis. Collectively our data suggest that *Dlx5* and *Dlx6* could be important actors for healthy implantation and development of the embryo.

***Dlx5* and *Dlx6* are involved in uterine adenogenesis**

The absence of *Dlx5/6* provokes a severe reduction in UG formation. As shown in qPCR experiment *Foxa2* is clearly downregulated in *Pgr^{Cre/+}; Dlx5/6^{flox/flox}* uteri. *Foxa2* is known to be implicated in the development of endoderm-derived organs such as the liver, pancreas, lung, and prostate (27, 28) and is a master gene for uterine adenogenesis (6). Post-natal conditional inactivation of *Foxa2* in the uterus leads to a total absence of UG formation and infertility (6). Our results suggest that *Dlx5* and *Dlx6* are upstream activators of *Foxa2* during uterine glandular development.

Wnt family genes organize pre- and post-natal development of the uterus through complex epithelial-mesenchymal interactions and several members of the Wnt canonical pathway are involved in regulation of uterine adenogenesis (29).

Wnt7a is a key regulator of adenogenesis. *Wnt7a* inactivation (30) or conditional inactivation in the uterus (31), leads to defect in adenogenesis, and provokes infertility. In these conditional mutants, a clear down regulation of *Foxa2* is also observed (31). We show that the inactivation of *Dlx5* and *Dlx6* provokes an upregulation of *Wnt7a*, suggesting the homeostasis of uterine adenogenesis is assured through a complex regulatory network involving *Foxa2*. This hypothesis is supported by the fact that other genes follow the same deregulation in *Pgr^{Cre/+}; Dlx5/6^{flox/flox}* as in *Wnt7a* conditional mutant (*Msx1* is down regulated, *Msx2* is upregulated, *Hoxa10* and *Hoxa11* are downregulated (31) suggesting that *Dlx5* and *Dlx6* act through *Wnt7a* signalling. It has been suggested that *Wnt7a* during adenogenesis could be

repressed in one cell of LE to form glands. It is interesting to note that also during limb development epithelial expression in the apical ectodermal ridge initiates a complex signalling network that includes Wnt7a, Msx1 and Msx2.

Deregulation of epithelial genes in the absence of *Dlx5/6*

Wnt11 and *Wnt7a* are upregulated in *Pgr^{Cre/+}; Dlx5/6^{flox/flox}*, suggesting Dlx5 and Dlx6 could act as repressors of these genes. *Wnt11* is expressed in LE and GE, and *Wnt7a* is expressed in LE. While inactivation of *Wnt7a* provokes the absence of glands, *Wnt11* conditional inactivation does not produce any obvious uterine phenotype. The only deregulation observed in the absence of Wnt11 is a deregulation of *Vangl2* (29) a gene known to act on the definition of cellular planar polarity. Indeed, *Vangl2* mutants present an altered cell polarity in LE (32). Therefore the upregulation of *Wnt11* observed in our Dlx5/6 conditional mutant, might explain the abnormal cell polarity of the LE.

Moreover two other homeobox genes involved in the control of epithelial signalling are deregulated in *Pgr^{Cre/+}; Dlx5/6^{flox/flox}* uteri: *Msx1* is downregulated and *Msx2* is upregulated. *Msx1* is expressed during peri-implantation in the luminal epithelium. *Msx1/2* conditional mutants have an implantation failure due to an absence of epithelial polarization similar to what is observed in the upregulation of *Wnt5a*.

The increasing number of luminal invaginations in *Dlx5/6* mutant could be linked to the reduction of adenogenesis. These uterine invaginations are at the origin of the UG formation, the absence of *Dlx5/6* could provoke an abnormal fusion of the luminal epithelium at the bottom of these invaginations which would fail to form glands. Moreover the change in epithelial cell morphology, suggests that Dlx5/6 affect the epithelial cytoskeleton permitting the formation of glands.

Implications for human pathology

We then examined the expression of *DLX5* in normal and pathological human uteri. In normal uterus *DLX5* is strongly expressed by both the glandular and luminal epithelium. We focused our attention on the distribution of Dlx5 in the ectopic endometrium of endometriotic lesions, the reason for this choice is that it has been shown that *DLX5* is strongly deregulated in endometriosis. We observe that in endometriosis, changes in epithelial morphology are accompanied by a strong reduction of the expression of *DLX5*. Remarkably the changes in epithelial morphology resemble closely those observed in conditionally inactivated mice,

suggesting that expression of DLX5 in the uterine luminal epithelium is essential also in human to assure normal uterine function.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Procedures involving animals were conducted in accordance with the directives of the European Community (council directive 86/609) and the French Agriculture Ministry (council directive 87-848, 19 October 1987, permissions 00782 to GL). Mice were housed in specific pathogen-free and light, temperature (21°C) and humidity (50-60% relative humidity) controlled conditions. Food and water were available ad libitum. Animals were backcrossed with wild-type B6D2F1/N from Charles River Laboratory (Italy).

By targeted homologous recombination, we first put the exon 2 of *Dlx5* and *Dlx6* between two LoxP sites. Neo and Hygro were used as selective marker respectively for *Dlx5* and *Dlx6*, were put between FRT sites, and were excised by flippase recombinase. We first perform *Dlx5* recombinaison, we used ES cells from these mice to perform *Dlx6* recombination.

Genotyping mice

For genotyping, DNA was extracted from mice tails and uteri using KAPA express extract kit (Kapa Biosystems). Mutant mice were genotyped by PCR using allele-specific primers using TAKARA Ex Taq (Takara) or KAPA2G Fast Genotyping PCR mix (Kapa Biosystems):

-*Dlx5*^{LacZ/+} mice: 1. Z1: 5'-GCGTTACCCAACCTTAATCG-3', 2. Z2 : 5'-TGTGAGCGAGTACAACC-3', a PCR product of 350bp shows LacZ allele.

-*Dlx5*-floxed-delta: Er: 1. 5'-TTCCATCCCTAAAGCGAAGAACTTG-3', Lf: 2. 5'-CCTCCCAGAAATACCCCTTCTCTTG-3'. PCR product of 753bp shows wild type allele, 943bp product shows floxed allele and a 244bp product shows the recombinant Δ allele.

-*Dlx6*-floxed-delta: Er2: 1. 5'-CTTTAGGCGTTGGGAAAAGCCAGG-3', Lf2: 2. 5'-CTGGTCTCAGCTCATAAGTTTCCTTC-3'. PCR product of 856bp shows wild type allele, 1014bp product shows floxed allele and a 193bp product shows the recombinant Δ allele.

-*Pgr-Cre* mice: 1. Cre-L1: 5'-GCCACCAGCCAGCTATCAACTC-3', 2. Cre-R1: 5'-TTGCCCTGTTTCACTATCCAG-3'. PCR product of 250bp shows cre-recombinase gene.

Pgr Cre mice were provided by John P. Lydon and Francesco De Mayo Houston TX (24). To obtain *Dlx5*^{LacZ/+} mice we crossbreed *Dlx5*^{LacZ/+} males with B6D2F1N females. To obtain *Pgr*^{cre/+}; *Dlx5/6*^{fllox/fllox} mice, we crossbreed *Pgr*^{cre/+}; *Dlx5/6*^{fllox/+} males with *Dlx5/6*^{fllox/fllox} females.

Fertility test

For testing fertility, a total of 75 sexually mature female mice (2 month to 1 year old) were bred with WT males (B6D2F1N) for up to 6 month, and vaginal plugs were detected. The litter size per mice during this period was recorded for each genotype.

Histological analysis

Tissues sample and treatment

Uteri were dissected in Phosphate Buffer Saline (PBS). Pictures of whole uterus were taken, and each uterine horn was measured for width (at two sites), length and area. Uteri were fixed in 4% paraformaldehyde for 1 day at 4°C or in Bouin's fixative solution (75% saturated picric acid, 20% formol 40%, 5% acetic acid) for 7 days at 4°C. Some of them were cryoprotected in 4% paraformaldehyde with 15 % sucrose for 1 day, then in sucrose 30% for 1 day and stored at -80°C before further use. Fixed uteri were embedded in paraffin and 8- µm-thick sections were prepared. Cryoprotected uteri were embedded in OCT (Leica) and 12-µm-thick sections were prepared. Uteri sections were stained with Mallory Trichromic protocol (Groat's hematoxylin, acid fuchsin, aniline blue/orange G (33)). Some other uteri sections were stained with hematoxylin and eosine.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on deparaffinized sections using standard protocols of the Dako Envision kit or the Dako ARK kit. Anti-DLX5 polyclonal rabbit primary antibody was used at 1/200 dilution, diluted in PBS with 5% Fetal Calf Serum (FCS) concentrations.

In situ hybridization

Gene expression was analyzed by in situ hybridization on floating sections of 50µm. using digoxigenin (DIG)-UTP labelled antisense RNA probes against Dlx5 and Dlx6. After hybridization, probes were detected using an alkaline-phosphatase-conjugated anti-DIG antibody and BM Purple substrate (Roche).

qPCR

Total RNA was isolated from uterine samples using an RNeasy minikit (Qiagen) according the manufacturer instructions. On-column deoxyribonuclease (Qiagen) digestion was

incorporated into an RNA isolation procedure to remove potential genomic DNA contamination. RNA concentration and the ratio of the absorbance at 260 and 280 nm were measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Reverse transcription was carried out using 600 or 200 ng total RNA and Superscript III (Invitrogen) or Primscript (Ozyme) reverse transcriptase to obtain cDNA. Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystem). The PCR program consisted of 95°C for 10 min, 40 cycles 95°C of 15 seconds, 60°C for 10 min. Relative gene expression were measured with Taqman gene expression assays (Life Technologies, France). All primers were Taqman pre-designed primers (Life Technologies). To measure the relative amount of PCR products, the Ct of Sdha was used as a control gene, was subtracted from the Ct of genes of interest to derive Δ Ct. The Δ Ct of mutant animals was compared with Δ Ct of control animals and the difference was assigned as $\Delta\Delta$ Ct. The fold change between two samples was then calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Statistical analysis

The Mann-Whitney unpaired test was conducted using Prism (Graphpad Software, La Jolla, CA) to calculate the differences between groups. All values are expressed as means \pm SEM of combined data from replicate experiments. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS

B.B. is recipient of a doctoral fellowship from the IDEAL European Consortium. This research was partially supported by the EU Consortia IDEAL (HEALTH-F2-2011-259679) and HUMAN (EU-FP7-HEALTH-602757).

We are grateful to Dr D Lydon (Huston, Texas) for the kind gift of PGR-cre mice.

We thank Aurélie Hagneau and Ocilia Fernandes, for technical assistance.

We are obliged to Yorick Gitton and Eglantine Heude for interesting discussions and constructive criticism.

A particular thank for the team in charge of mouse animal care and in particular M Stéphane Sosinsky and M Fabien Uridat.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors have no financial interests or conflict of interest to disclose.

FIGURE AND TABLE LEGENDS

Figure 1: *Dlx5* expression during uterine development

LacZ expression in female reproductive tract of *Dlx5^{LacZ/+}* mice at E15.5 (A), E16.5 (B), E18.5 (C). Before birth, *Dlx5* is expressed in the medial part of the Müllerian duct that corresponds to the future uterus. At E18.5, *Dlx5* expression is localized in the luminal epithelium of the prospective uterus as seen in *Dlx5^{LacZ/+}* mice and by *in situ* hybridization on sections of wild type pups. ut: uterus, cvx: cervix, ov: ovary, m: mesenchyme. Scale bar: (D) 100µm (E,F) 50µm.

Figure 2: *Dlx5* and *Dlx6* expression during uterine post-natal development

Uterine *LacZ* expression in *Dlx5^{LacZ/+}* mice during uterine post-natal development (A, B, C) and in the adult (D). *Dlx5* is expressed by the luminal and glandular epithelium during adenogenesis. In the adult, *Dlx5* expression is present in GE and in portions of the LE. *In situ* hybridization for *Dlx5* (E) and *Dlx6* mRNA (F) shows that both transcripts are present in GE and LE of the adult uterus. le: luminal epithelium, m: mesenchyme, ge: glandular epithelium, s: stroma. Scale bar: (A, B, C, D, E, F): 100µm. (A',B', C', D', E', F'): 50µm.

Figure 3: Post-natal deletion of *Dlx5* and *Dlx6* in the uterus

(A) Targeting strategy to generate *Dlx5/6^{fllox/fllox}* mice; at the end of the procedure, both exons 2 of *Dlx5* and *Dlx6* were framed between loxP sequences with selective markers framed between flippase recognition sequences. After flippase deletion *in vivo*, selective markers were excised. In the mutant allele after Cre-mediated deletion, the exons 2 of *Dlx5* and *Dlx6* are excised. (B) At PN25, the floxed (*fllox*) and the deleted (Δ) alleles of *Dlx5* were detected by PCR after crossing *Dlx5/6^{fllox/fllox}* females with *Pgr^{cre/+}*; *Dlx5/6^{fllox/+}* males. The Δ allele was present only in the uterus. Columns 1, 2 : PCR product for the *Dlx5* allele in tissues derived from *Pgr^{cre/+}*; *Dlx5/6^{fllox/+}* mouse, Q: tail, U: uterus. Columns 3, 4 : PCR for the *Cre* allele. 5, 6, 7, 8: Control samples. (C) qPCR shows relative expression of *Dlx5* and *Dlx6* mRNA in *Dlx5/6^{fllox/fllox}* and *Pgr^{cre/+}*; *Dlx5/6^{fllox/fllox}* uteri at PN25. Control gene: *Sdha*. *Dlx5* and *Dlx6* mRNA are no longer presents in the cre-deleted uterus.

Figure 4: *Dlx5/6* conditional deletion leads to abnormal lumen invaginations and impaired adenogenesis.

(A) Phenotype resulting from uterine *Dlx5/6* ablation in PN25 mouse. In the uterus, the lumen presents an higher number of large and bifurcated epithelial invaginations. Fewer or no uterine glands are observed in *Pgr^{cre/+}; Dlx5/6^{lox/lox}* uteri in comparison to *Dlx5/6^{lox/lox}* uteri. 3D lumen segmentation shows that, in the mutant, luminal invaginations are large and occupy relatively long segments of the uterus while, in controls, invaginations are thinner and localized. (B) The ovary of mutant and control are similar and present all class of follicles. Means of the number of uterine glands per cross section in control and mutant uteri. The number of uterine glands was significantly ($p = 0.0024$) lower in the mutant (1.681 ± 0.3064) than in controls (7.639 ± 1.328). Scale bar: 250 μ m.

Figure 5: *Dlx5/6* conditional deletion provokes abnormal luminal epithelium morphology.

The luminal epithelium of a *Pgr^{cre/+}; Dlx5/6^{lox/lox}* uterus (A, B) is compared to that of a control *Dlx5/6^{lox/lox}* uterus (B, D). The luminal epithelium in *Pgr^{cre/+}; Dlx5/6^{lox/lox}* mice are more cuboidal (D) than the simple columnar epithelium seen in normal mice (C). In mutant epithelium, the cytoplasm is not elongated at the apical pole and the nucleus is round and localized in the center of the cell; on the contrary, control LE present an elongated nucleus localized in the basal pole. le: luminal epithelium, s: stroma. Scale bar: 50 μ m.

Figure 6: Effect of *Dlx5* and *Dlx6* inactivation on the expression of key genes of uterine maturation.

Relative mRNA expression of genes implicated in post-natal development of the uterus from PN25 *Dlx5/6^{lox/lox}* and *Pgr^{cre/+}; Dlx5/6^{lox/lox}* mice. Control gene: *Sdha*. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, Mann and Whitney test analysis.

Figure 7: DLX5 protein is present in normal human endometrial GE and has an abnormal distribution in endometriotic lesions

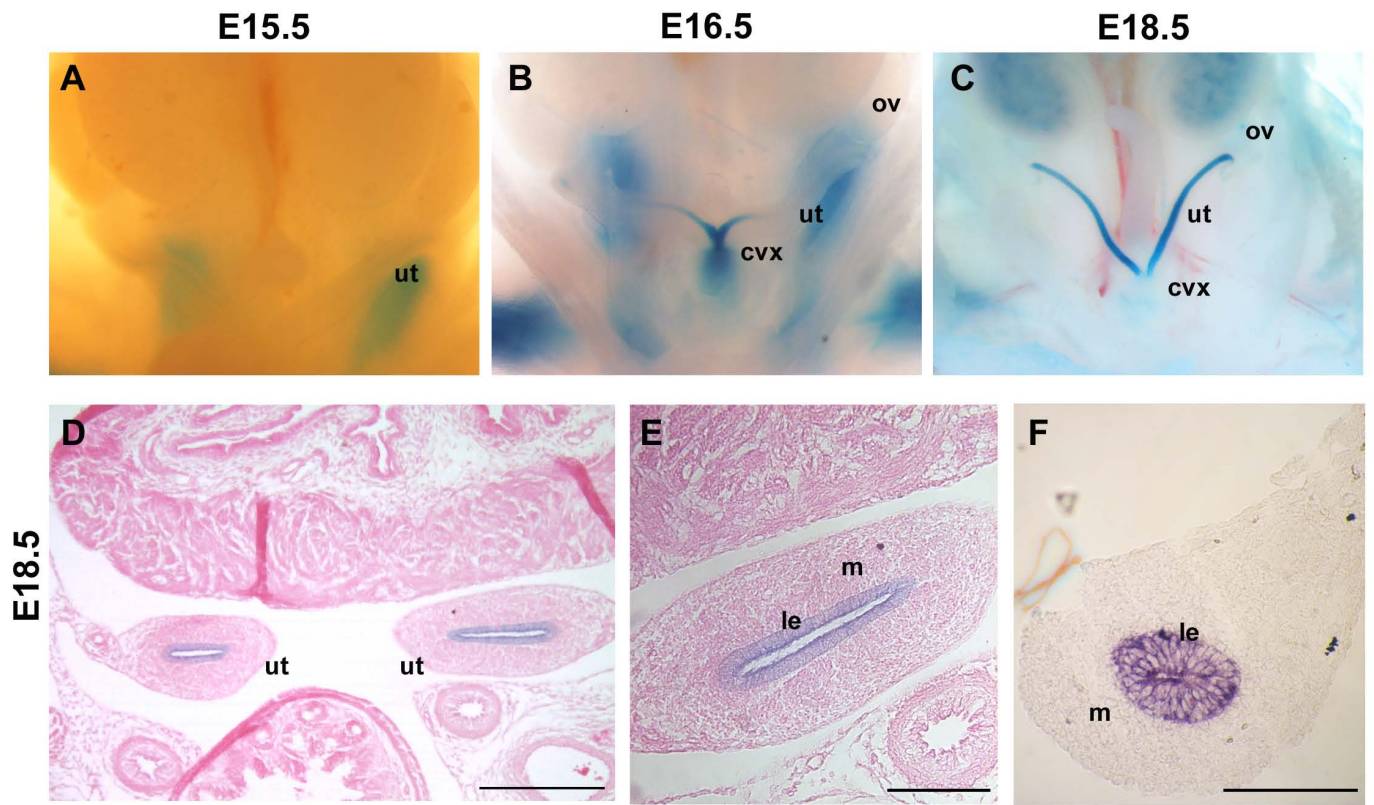
DLX5 immunostaining in human normal endometrium and in endometriotic lesions. DLX5 is present in GE of the normal endometrium. The epithelium of endometriotic lesions shows an heterogenous and weak immunoreactivity to anti-DLX5 antibodies.

REFERENCES

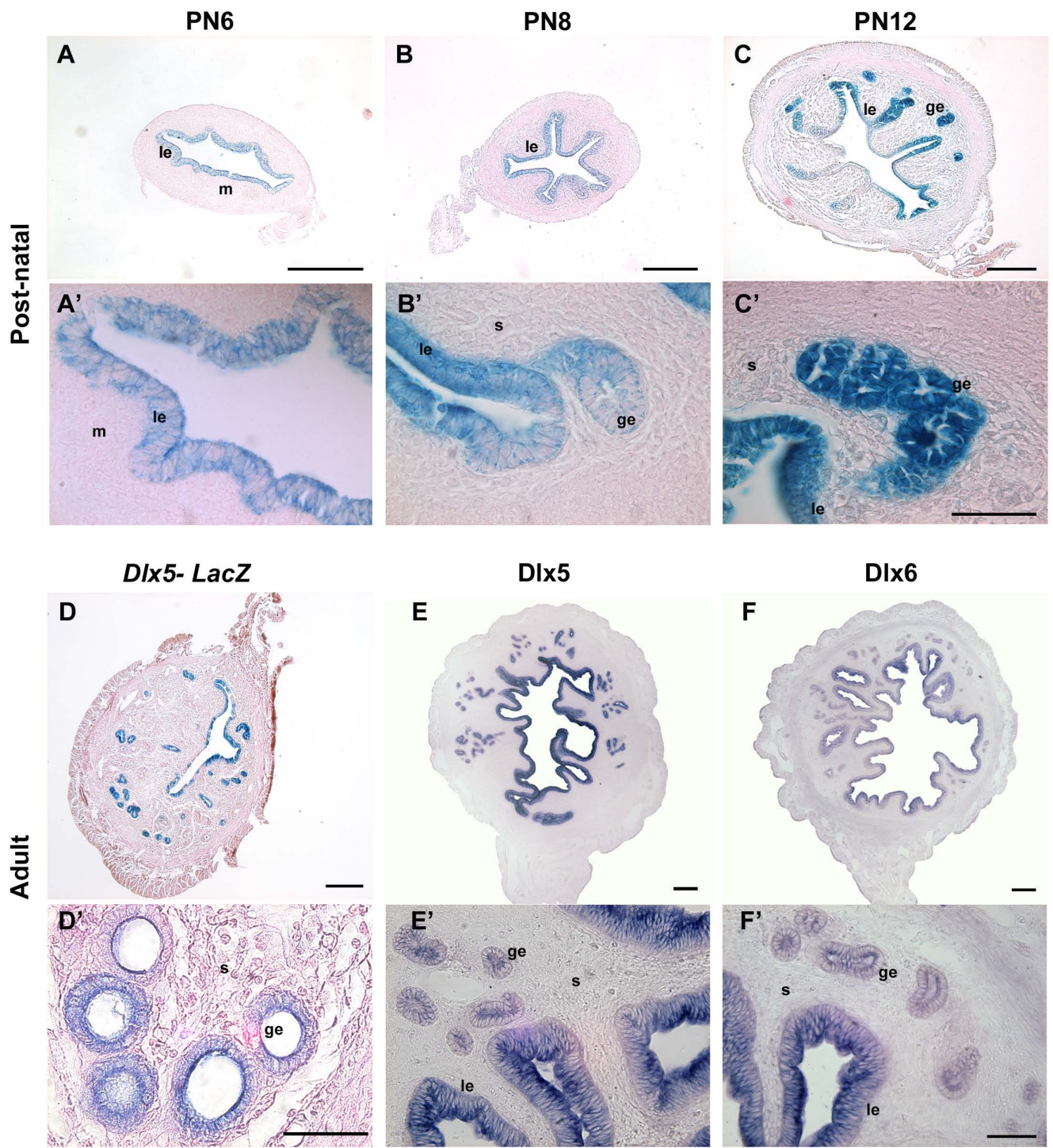
- 1 Cunha, G.R. (1976) Stromal induction and specification of morphogenesis and cytodifferentiation of the epithelia of the Mullerian ducts and urogenital sinus during development of the uterus and vagina in mice. *The Journal of experimental zoology*, **196**, 361-370.
- 2 Brody, J.R. and Cunha, G.R. (1989) Histologic, morphometric, and immunocytochemical analysis of myometrial development in rats and mice: I. Normal development. *The American journal of anatomy*, **186**, 1-20.
- 3 Kobayashi, A. and Behringer, R.R. (2003) Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nature reviews. Genetics*, **4**, 969-980.
- 4 Spencer, T.E., Hayashi, K., Hu, J. and Carpenter, K.D. (2005) Comparative developmental biology of the mammalian uterus. *Current topics in developmental biology*, **68**, 85-122.
- 5 Gray, C.A., Bartol, F.F., Tarleton, B.J., Wiley, A.A., Johnson, G.A., Bazer, F.W. and Spencer, T.E. (2001) Developmental biology of uterine glands. *Biology of reproduction*, **65**, 1311-1323.
- 6 Jeong, J.W., Kwak, I., Lee, K.Y., Kim, T.H., Large, M.J., Stewart, C.L., Kaestner, K.H., Lydon, J.P. and DeMayo, F.J. (2010) Foxa2 is essential for mouse endometrial gland development and fertility. *Biology of reproduction*, **83**, 396-403.
- 7 Gray, C.A., Burghardt, R.C., Johnson, G.A., Bazer, F.W. and Spencer, T.E. (2002) Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction*, **124**, 289-300.
- 8 Dey, S.K., Lim, H., Das, S.K., Reese, J., Paria, B.C., Daikoku, T. and Wang, H. (2004) Molecular cues to implantation. *Endocrine reviews*, **25**, 341-373.
- 9 Cha, J., Sun, X. and Dey, S.K. (2012) Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nature medicine*, **18**, 1754-1767.
- 10 Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F. and Abbondanzo, S.J. (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, **359**, 76-79.
- 11 King, A., Hiby, S.E., Gardner, L., Joseph, S., Bowen, J.M., Verma, S., Burrows, T.D. and Loke, Y.W. (2000) Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors--a review. *Placenta*, **21 Suppl A**, S81-85.
- 12 Wang, H. and Dey, S.K. (2006) Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature reviews. Genetics*, **7**, 185-199.
- 13 Spencer, T.E., Dunlap, K.A. and Filant, J. (2012) Comparative developmental biology of the uterus: insights into mechanisms and developmental disruption. *Molecular and cellular endocrinology*, **354**, 34-53.
- 14 Merlo, G.R., Paleari, L., Mantero, S., Genova, F., Beverdam, A., Palmisano, G.L., Barbieri, O. and Levi, G. (2002) Mouse model of split hand/foot malformation type I. *Genesis*, **33**, 97-101.
- 15 Robledo, R.F., 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.

- 16 Beverdam, A., Merlo, G.R., Paleari, L., Mantero, S., Genova, F., Barbieri, O., Janvier, P. and Levi, G. (2002) Jaw transformation with gain of symmetry after Dlx5/Dlx6 inactivation: mirror of the past? *Genesis*, **34**, 221-227.
- 17 Samee, N., Geoffroy, V., Marty, C., Schiltz, C., Vieux-Rochas, M., Levi, G. and de Vernejoul, M.C. (2008) Dlx5, a positive regulator of osteoblastogenesis, is essential for osteoblast-osteoclast coupling. *The American journal of pathology*, **173**, 773-780.
- 18 Nishida, H., Miyagawa, S., Vieux-Rochas, M., Morini, M., Ogino, Y., Suzuki, K., Nakagata, N., Choi, H.S., Levi, G. and Yamada, G. (2008) Positive regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression through the interaction between Dlx and GATA-4 for testicular steroidogenesis. *Endocrinology*, **149**, 2090-2097.
- 19 Bouhali, K., Dipietromaria, A., Fontaine, A., Caburet, S., Barbieri, O., Bellessort, B., Fellous, M., Veitia, R.A. and Levi, G. (2011) Allelic reduction of Dlx5 and Dlx6 results in early follicular depletion: a new mouse model of primary ovarian insufficiency. *Hum Mol Genet*, **20**, 2642-2650.
- 20 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. *et al.* (2006) Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology*, **147**, 1097-1121.
- 21 Hu, W.P., Tay, S.K. and Zhao, Y. (2006) Endometriosis-specific genes identified by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction expression profiling of endometriosis versus autologous uterine endometrium. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **91**, 228-238.
- 22 Maxwell, G.L., Chandramouli, G.V., Dainty, L., Litzi, T.J., Berchuck, A., Barrett, J.C. and Risinger, J.I. (2005) Microarray analysis of endometrial carcinomas and mixed mullerian tumors reveals distinct gene expression profiles associated with different histologic types of uterine cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **11**, 4056-4066.
- 23 Risinger, J.I., Maxwell, G.L., Chandramouli, G.V., Jazaeri, A., Aprelikova, O., Patterson, T., Berchuck, A. and Barrett, J.C. (2003) Microarray analysis reveals distinct gene expression profiles among different histologic types of endometrial cancer. *Cancer research*, **63**, 6-11.
- 24 Soyak, S.M., Mukherjee, A., Lee, K.Y., Li, J., Li, H., DeMayo, F.J. and Lydon, J.P. (2005) Cre-mediated recombination in cell lineages that express the progesterone receptor. *Genesis*, **41**, 58-66.
- 25 Franco, H.L., Jeong, J.W., Tsai, S.Y., Lydon, J.P. and DeMayo, F.J. (2008) In vivo analysis of progesterone receptor action in the uterus during embryo implantation. *Seminars in cell & developmental biology*, **19**, 178-186.
- 26 Ismail, P.M., Li, J., DeMayo, F.J., O'Malley, B.W. and Lydon, J.P. (2002) A novel LacZ reporter mouse reveals complex regulation of the progesterone receptor promoter during mammary gland development. *Mol Endocrinol*, **16**, 2475-2489.
- 27 Besnard, V., Wert, S.E., Hull, W.M. and Whitsett, J.A. (2004) Immunohistochemical localization of Foxa1 and Foxa2 in mouse embryos and adult tissues. *Gene expression patterns : GEP*, **5**, 193-208.
- 28 Kaestner, K.H. (2010) The FoxA factors in organogenesis and differentiation. *Current opinion in genetics & development*, **20**, 527-532.
- 29 Hayashi, K., Yoshioka, S., Reardon, S.N., Rucker, E.B., 3rd, Spencer, T.E., DeMayo, F.J., Lydon, J.P. and MacLean, J.A., 2nd. (2011) WNTs in the neonatal mouse uterus: potential regulation of endometrial gland development. *Biology of reproduction*, **84**, 308-319.

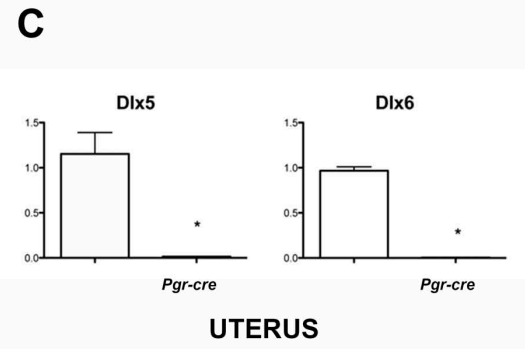
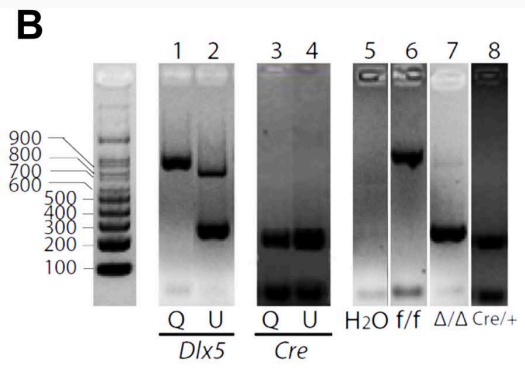
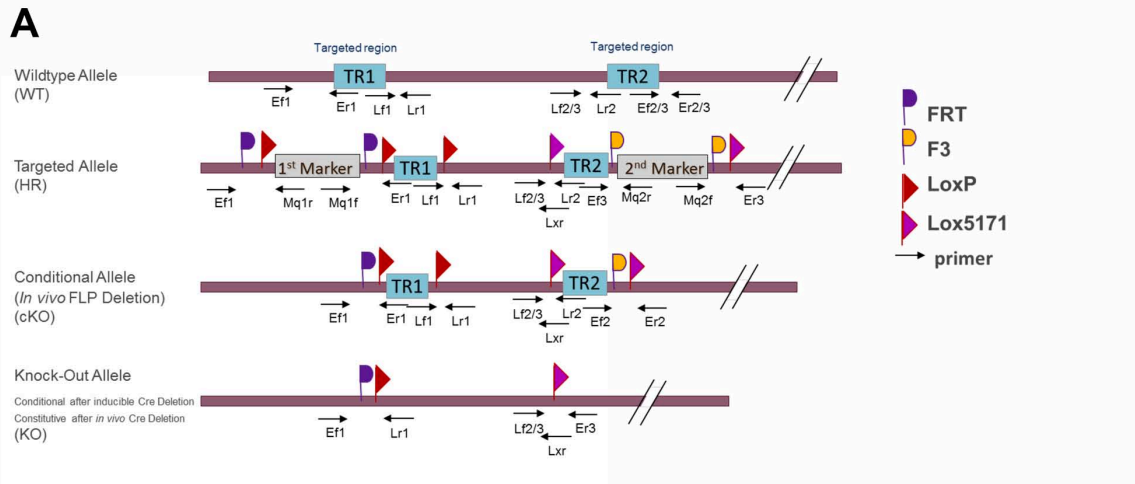
- 30 Miller, C. and Sassoon, D.A. (1998) Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Development*, **125**, 3201-3211.
- 31 Dunlap, K.A., Filant, J., Hayashi, K., Rucker, E.B., 3rd, Song, G., Deng, J.M., Behringer, R.R., DeMayo, F.J., Lydon, J., Jeong, J.W. *et al.* (2011) Postnatal deletion of Wnt7a inhibits uterine gland morphogenesis and compromises adult fertility in mice. *Biology of reproduction*, **85**, 386-396.
- 32 Vandenberg, A.L. and Sassoon, D.A. (2009) Non-canonical Wnt signaling regulates cell polarity in female reproductive tract development via van gogh-like 2. *Development*, **136**, 1559-1570.
- 33 Sato, T., Kurihara, Y., Asai, R., Kawamura, Y., Tonami, K., Uchijima, Y., Heude, E., Ekker, M., Levi, G. and Kurihara, H. (2008) An endothelin-1 switch specifies maxillomandibular identity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 18806-18811.



Bellessort et al. Figure 1



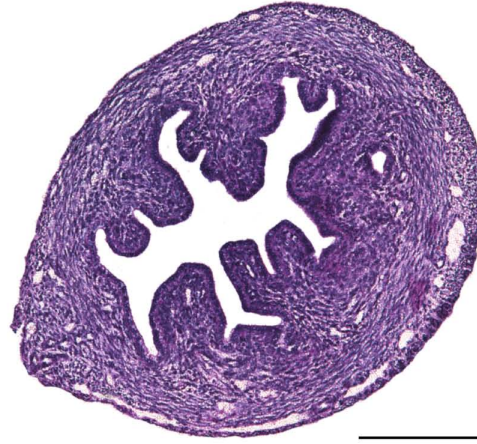
Bellessort et al. Figure 2



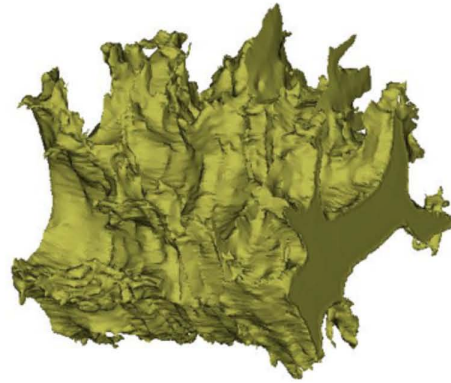
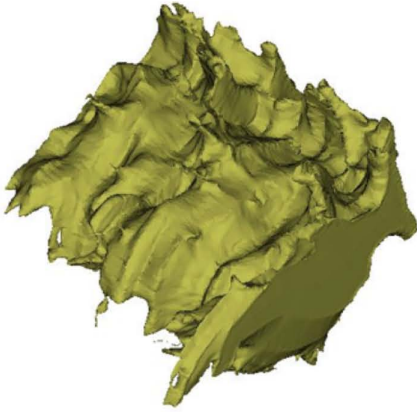
Bellessort et al. Figure 3

A*Dlx5/6*^{flox/flox}*Pgr*^{cre/+}; *Dlx5/6*^{flox/flox}

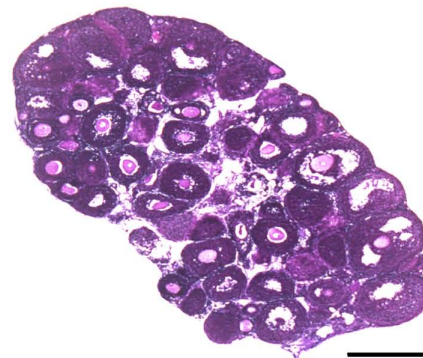
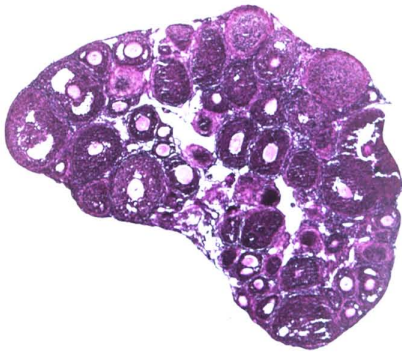
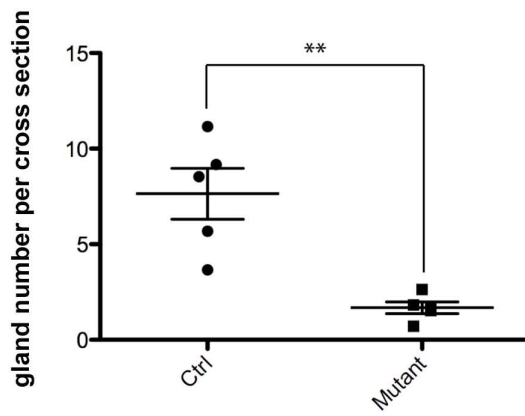
Uterus



3D lumen segmentation

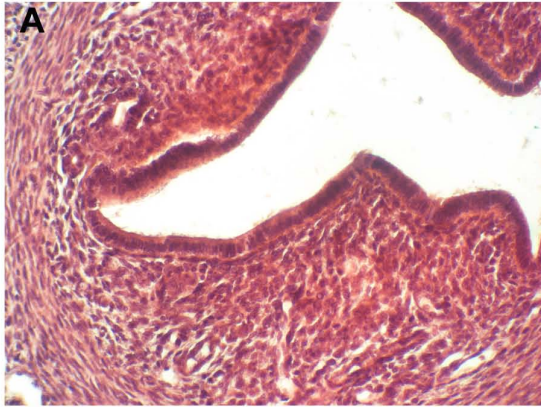


Ovary

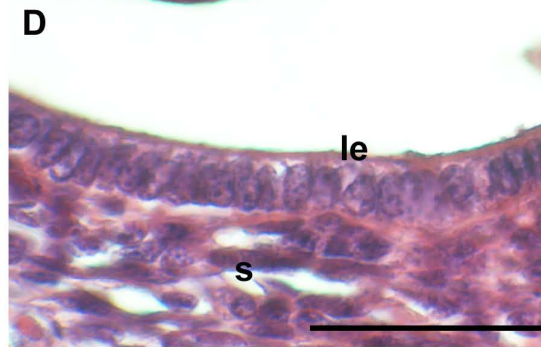
**B**

Bellessort et al. Figure 4

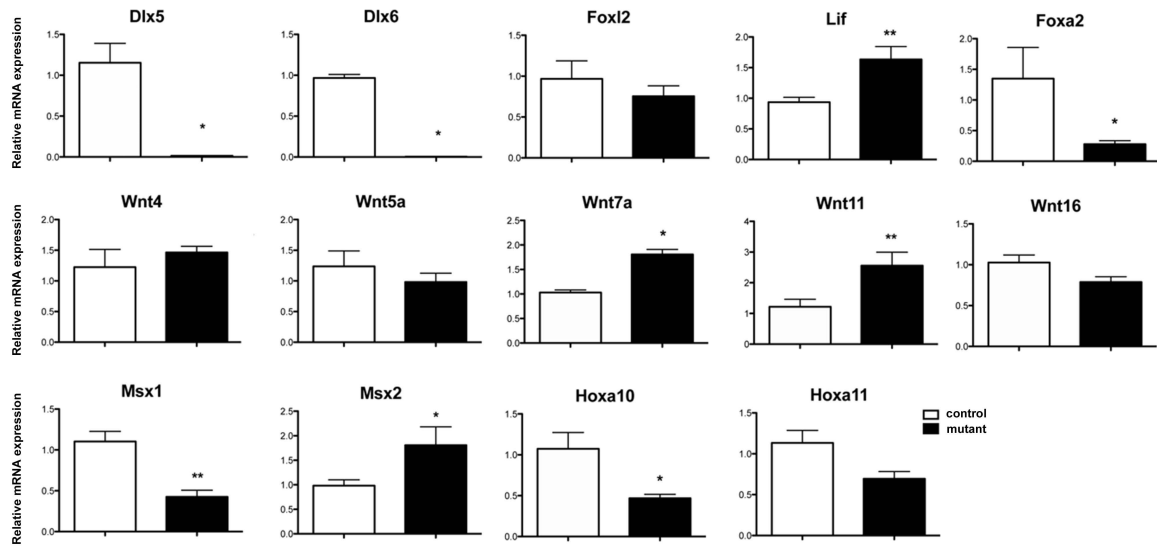
Dlx5/6^{flox/flox}



Pgr^{cre/+}; *Dlx5/6*^{flox/flox}



Bellessort et al. Figure 5



Bellessort et al. Figure 6

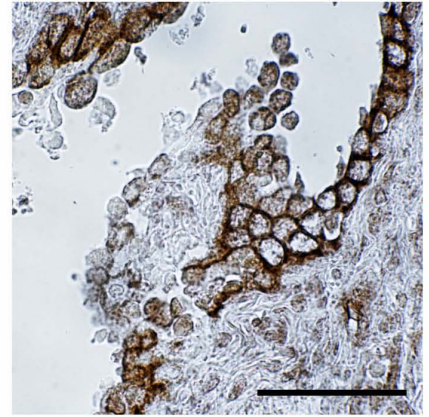
Anti-Dlx5 immunostaining



Normal uterine epithelium



Endometriosis



Bellessort et al. Figure 7

6. RESUME DE L'ARTICLE 3

Le syndrome du BPES est caractérisé par une fissure palpébrale étroite et une dysplasie ou une absence des muscles éleveurs des paupières. *Foxl2* est le seul gène connu comme étant muté dans ce syndrome. Cependant, aucune étude ne s'est penchée sur les origines des malformations craniofaciales associées à ce gène. Dans cette étude, nous présentons les détails des processus développementaux conduisant aux malformations associées à l'absence de *Foxl2* par l'étude de différents modèles murins.

6.1. *Foxl2* est exprimé dans les cellules de la crête neurale céphalique et les cellules du mésoderme crânien.

Le développement craniofacial implique la migration, la différenciation synchronisée et la coopération de plusieurs types cellulaires incluant les cellules de la crête neurale céphalique (CCNC) et des cellules du mésoderme crânien (CMC). Dans cette étude, nous avons montré par l'utilisation des souris rapportrices *Foxl2^{LacZ/+}*, que *Foxl2* était exprimé à E8.5/E9.5 au niveau d'une région restreinte du mésencéphale incluant des CCNC et des CMC, qui donnent origine aux muscles et os du crâne et participent à la formation des structures péri-oculaires. A des stades plus tardifs, nous avons observé que *Foxl2* s'exprime dans les structures péri-oculaires durant le développement de l'œil, à la fois dans des dérivés de crêtes neurales (paupière inférieure, certains cartilages et os dérivés des CCNC incluant l'os sphénoïde et l'os frontal) et dans des dérivés de CMC incluant la paupière supérieure et les muscles extra-oculaires (muscles oculomoteurs et releveur de la paupière supérieure).

6.2. *Foxl2* est requis pour la fermeture des paupières

L'analyse des mutants *Foxl2^{-/-}* a montré que les protubérances à l'origine des paupières ne sont pas visibles chez les mutants à E13.5. A E15.5 jusqu'à PN0, les extensions du périoderme qui permettent la formation des paupières ne sont pas présentes. De E16.5 à P0, on remarque également que suite à ces défauts de formation des paupières, l'œil est affecté, présentant une réduction de la cornée. Ces données suggèrent que *Foxl2* a un rôle central dans le développement précoce des paupières et leur extension.

6.3. L'inactivation de *Foxl2* interfère avec le développement des muscles extra-oculaires

L'analyse des mutants pour *Foxl2* montre des défauts des muscles péri-oculaires. Ces muscles sont bien différenciés mais présentent des morphologies, des points d'ancrages et des trajectoires anormales. Les muscles les plus affectés sont impliqués dans l'ouverture des paupières (le levator palpebrae superioris (LPS) et Müller et leur fermeture (orbicularis oculi) également touchés dans le BPES. Afin de savoir si ces défauts sont dus à l'absence d'expression de *Foxl2* dans les CCNC ou les CMC, des inactivations sélectives ont été faites. Celles-ci ont montré que l'inactivation spécifique de *Foxl2* dans les CCNC présentent les mêmes défauts d'attachement du LPS, et une absence des muscles obliques inférieur et supérieur, comme chez le *Foxl2*^{-/-}. L'inactivation spécifique dans les CMC présente un phénotype moindre, avec des muscles dont la taille est légèrement réduite, montrant que le phénotype des muscles oculaires des *Foxl2*^{-/-} est causé principalement par l'absence de *Foxl2* dans les CCNC. Ceci suggère que l'expression de *Foxl2* dans le mésoderme pourrait avoir uniquement un effet trophique déterminant la taille du muscle, alors que l'expression dans les CCNC serait requise pour déterminer le positionnement des muscles extra-oculaires. L'absence de *Foxl2* dans les CCNC pourrait changer leurs propriétés et empêcher le développement musculaire normal. De plus, les CCNC pourraient jouer un rôle important sur l'attachement des muscles, étant aussi progénitrices des tendons, des os et des cartilages.

6.4. Défauts squelettiques des souris inactivées pour *Foxl2*

Foxl2 étant exprimé dans les CCNC et le CMC qui sont également à l'origine des os craniofaciaux, nous avons analysé le phénotype crânien des souris inactivées pour *Foxl2*. Cette analyse a montré que les petites ailes du presphénoïde sont fortement réduites. On note également une fusion des os maxillaires avec les os prémaxillaire et jugaux. L'inactivation spécifique de *Foxl2* dans les CCNC provoque une fusion des os jugaux ainsi qu'une fusion des os maxillaire-prémaxillaire, tandis que l'inactivation de *Foxl2* dans le CMC provoque un défaut du sphénoïde. Les défauts observés chez les souris *Foxl2*^{-/-} sont donc un composite de défauts CNCC et CMC.

En conclusion, nos résultats présentent un nouveau regard sur les origines développementales complexes du BPES et permettent de mieux comprendre les origines des anomalies oculaires associées à ce syndrome.

7. ARTICLE 3

Etiology of craniofacial malformations in mouse models of blepharophimosis, ptosis and epicanthus inversus syndrome

Églantine Heude, **Brice Bellessort**, Anastasia Fontaine, Manatsu Hamazaki, Anna-Corina Treier, Mathias Treier, Giovanni Levi and Nicolas Narboux-Nême

Human Molecular Genetics, 2015 Mar 15;24(6):1670-81



ORIGINAL ARTICLE

Etiology of craniofacial malformations in mouse models of blepharophimosis, ptosis and epicanthus inversus syndrome

Églantine Heude¹, Brice Bellessort¹, Anastasia Fontaine¹, Manatsu Hamazaki², Anna-Corina Treier³, Mathias Treier³, Giovanni Levi^{1,†}, and Nicolas Narboux-Nême^{1,†,*}

¹Évolution des Régulations Endocriniennes, CNRS UMR 7221, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris 75005, France, ²Department of Physiological Chemistry and Metabolism, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan, and ³Max-Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC) - Genetics of Metabolic and Reproductive Disorders, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin, Germany

*To whom correspondence should be addressed at: CNRS UMR7221, Évolution des Régulations endocriniennes, Muséum national d'Histoire naturelle, 7, rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France. Tel: +33 140798027; Fax: +33 140793618; Email: nnarboux-neme@mnhn.fr

Abstract

Blepharophimosis, ptosis, epicanthus-inversus syndrome (BPES) is an autosomal dominant genetic disorder characterized by narrow palpebral fissures and eyelid levator muscle defects. BPES is often associated to premature ovarian insufficiency (BPES type I). *FOXL2*, a member of the forkhead transcription factor family, is the only gene known to be mutated in BPES. *Foxl2* is essential for maintenance of ovarian identity, but the developmental origin of the facial malformations of BPES remains, so far, unexplained. In this study, we provide the first detailed account of the developmental processes leading to the craniofacial malformations associated to *Foxl2*. We show that, during development, *Foxl2* is expressed both by Cranial Neural Crest Cells (CNCCs) and by Cranial Mesodermal Cells (CMCs), which give rise to skeletal (CNCCs and CMCs) and muscular (CMCs) components of the head. Using mice in which *Foxl2* is selectively inactivated in either CNCCs or CMCs, we reveal that expression of *Foxl2* in CNCCs is essential for the development of extraocular muscles. Indeed, inactivation of *Foxl2* in CMCs has only minor effects on muscle development, whereas its inactivation in CNCCs provokes a severe hypoplasia of the *levator palpebrae superioris* and of the superior and inferior oblique muscles. We further show that *Foxl2* deletion in either CNCCs or CMCs prevents eyelid closure and induces subtle skeletal developmental defects. Our results provide new insights in the complex developmental origin of human BPES and could help to understand the origin of other ocular anomalies associated to this syndrome.

Introduction

Blepharophimosis, Ptosis, Epicanthus inversus Syndrome (BPES) is a rare, autosomal dominant syndrome with a prevalence of 1 for 50 000 births (1). BPES patients present complex eyelid malformations characterized by a narrowing of the horizontally eye

opening (blepharophimosis), droopy upper eyelids (ptosis), a skin fold arising upwards and inwards from the lower eyelid (*epicanthus inversus*) and lacrimal puncta anomalies, such as lateral displacement or stenosis. These patients often display an increased distance between the eyes (telecanthus). The ptosis is

[†] These authors contributed equally to this paper.

Received: September 19, 2014. Revised and Accepted: November 15, 2014.

© The Author 2014. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

due to a dysplasia, or absence, of the major eyelid elevator muscle: the *levator palpebrae superioris* (LPS) (2,3). Other ocular anomalies such as, refractive error, strabismus and amblyopia (4) are often associated to BPES. BPES diagnostic is mostly based on clinical examination of the patients. In female BPES patients, facial malformations can be associated (BPES type I) or not (BPES type II) to premature ovarian failure (5). At least 88% of BPES type I and II patients present a mutation or a deletion of *FOXL2* coding or regulatory sequences (OMIM 605597) (6–10). The variability of BPES phenotype results from the diversity of the genetic lesion at the origin of the disease: *FOXL2* mutations, modifications in shared regulatory sequences that can also affect the expression neighbouring genes or, in rare cases, chromosomal translocations (4). Rarely, nystagmus, euryblepharon, ectropion, microphthalmos, microcornea, trabecular dysgenesis, optic nerve hypoplasias, colobomas of the optic disk and congenital alacrima have also been reported in putative BPES patients, often without a proven molecular diagnosis (4,11–15). *FOXL2* codes for a forkhead/HNF3 transcription factor expressed in the developing and adult ovary (16,17). During mouse development, *Foxl2* is also expressed by the periocular mesenchyme and in the mesodermal core of pharyngeal arches 1–3 (6,18,19).

Craniofacial development requires long-distance migration, synchronized differentiation and cooperation of many cell types, including cranial neural crest cells (CNCCs) and cranial mesodermal cells (CMCs). CNCCs give rise to most chondrocranial and dermatocranial elements (20–22). Conversely, CMCs are at the origin of craniofacial muscles and some posterior skeletal elements of the skull (22–25). Although the craniofacial expression of *Foxl2* has been reported (6,16), the aetiology of BPES facial signs remains unexplained. It has been proposed that *Foxl2* is predominantly expressed by CNCCs (26), while some of the signs of the disease imply CMCs derivatives such as palpebral muscles.

Several murine models with mutations or invalidation of *Foxl2* have been generated to study the specification and maintenance of ovarian identity, sex determination and fertility (18,19,27,28). Even if BPES in humans is caused by haploinsufficiency of *FOXL2*, many aspects of the human syndrome are well reproduced by mouse models carrying homozygous *Foxl2* mutations. Although *Foxl2* mutant mice present eyelid defects at birth with subsequent degeneration of the eye cups (6,29,30), the developmental processes associating *Foxl2* mutations to craniofacial development have been poorly analysed.

Here, we provide the first account of the aetiology of the craniofacial malformations associated to *Foxl2* mutations. To this end, beside mice carrying a constitutive, global *Foxl2* inactivation, we generated animals in which *Foxl2* is selectively deleted either in CNCCs or in CMCs. Our analyses demonstrate for the first time the complex aetiology of the facial development, which implies both CNCCs and CMCs derivative providing a conceptual framework to decode the origin of human BPES facial defects.

Results

Foxl2 is expressed by CNCCs and CMCs derivatives

To determine the *Foxl2* expression pattern during craniofacial development, we used a *Foxl2^{LacZ/+}* strain (19). At E8.5, during lens placode formation, *Foxl2* is expressed in a restricted anterior region of the embryo at the level of the mesencephalon immediately caudal to the developing eye (Fig. 1A, E8.5); this region provides the CNCCs and CMCs (31,32) that, at later developmental stages, participate to form periocular structures. At E9.5, β -Galactosidase

(β -GAL) positive mesenchymal cells surround the eye, with the exception of its rostral aspect (Fig. 1A, E9.5). Sections of E9.5 embryos show that, at the mesencephalic level, all mesenchymal cells, including migrating CNCCs and CMCs, as well as populations of non-neural ectodermal cells and endodermal cells are β -GAL positive while the neural ectoderm and post-migratory CNCCs in the first pharyngeal arch are negative (data not shown). As the eye develops, the periocular *Foxl2* expression profile is maintained; eventually β -GAL positive cells completely surround the eye (Fig. 1A E10.5–E13.5). Other structures expressing *Foxl2* during craniofacial development include the maxillary arch, the pharyngeal endoderm, the mesodermal core of pharyngeal arches 1 and 2 (PA1, PA2) and their derivatives (Fig. 1A).

We used double immunohistochemistry to determine the identity of *Foxl2*-positive cells. At E11.5, a subpopulation of MYOD-positive periocular muscle precursors also expressed *Foxl2* (Fig. 1B and B' arrows). We used *Wnt1^{ERT2Cre/+}ROSA^{LacZ/+}*, a tamoxifen inducible Cre expressing mouse strain, which CNCCs progeny are permanently labelled by *LacZ* expression, to examine *Foxl2* expression by CNCCs. When the effects of tamoxifen injection at E7 and E7.5 were analysed at E13.5, the majority of CNCCs derivatives in the lower eyelid were *Foxl2*-positive (Fig. 1C and C', arrowheads).

We wondered which structures and cell types of the newborn mouse head derive from *Foxl2* expressing cells. To this end, we analysed pups issued from a *Foxl2^{Cre/+}ROSA^{LacZ/+}* crossing, permanently labelling *Foxl2* expressing cells and their derivatives by *LacZ* expression. In the cephalic region of these mice, both CMCs and CNCCs derivatives were β -GAL positive including: (i) all the muscles derived from the mesodermal core of PA1 and PA2; (Fig. 1A and D, Supplementary Material, Fig. S1B and D); (ii) certain CNCCs-derived periocular cartilages and bones including the sphenoid and the frontal bones (Fig. 1D and D'); (iii) the upper (CMCs-derived) and lower (CNCCs-derived) eyelids (Fig. 1D). The lacrimal, salivary and Harderian glands were also positive (Fig. 1D, Supplementary Material, Fig. S1A). Most other structures of the head did not derive from *Foxl2*-positive precursors (Fig. 1D, Supplementary Material, Fig. S1B).

Foxl2 is required for foetal eyelid closure

The eyelids of *Foxl2*-null mice (*Foxl2*-KO) are open at birth (6,29,30); the origin of this malformation has not been analysed. To address this question, we monitored *Foxl2* expression at key stages of ocular development and the consequences of its invalidation on palpebral formation. In mouse, eyelid protuberances appear at E13.5 and primitive eyelids are clearly visible at E15.5 (Fig. 2B1 and B2). At E15.5, rounded peridermal cells at the eyelid margin proliferate and converge until complete eyelid closure at E16.5 (Fig. 2B2 and B3, Supplementary Material, Fig. S2A) (33).

Foxl2 is expressed by mesenchymal cells of the upper and lower eyelid precursors at E11.5 and E13.5, before overt eyelid formation (Fig. 1B and C). At E15.5, *FOXL2* protein is present in most upper (Fig. 2A2) and lower (Fig. 2A3) eyelid mesenchymal cells, in the extraocular muscles (Fig. 2A4), in the frontal bone (Fig. 2A4) and in the Harderian gland (Fig. 2A5), but is absent from the eyelid epithelium (Fig. 2A1–A3) and other eye components.

In E13.5 *Foxl2*-KO embryos, eyelid protuberances are not yet visible (Fig. 2C1). At E15.5, the periderm extension, which permits eyelid closure (33), does not form in *Foxl2*-KO (Supplementary Material, Fig. S2B); in mutant foetuses, the defect of eyelid growth persists from E15.5 to P0 (Fig. 2C2–C4) resulting in an open eye phenotype at birth. Moreover, the Harderian gland is not present in *Foxl2*-KO mice (Fig. 2C3–C4, black asterisks).

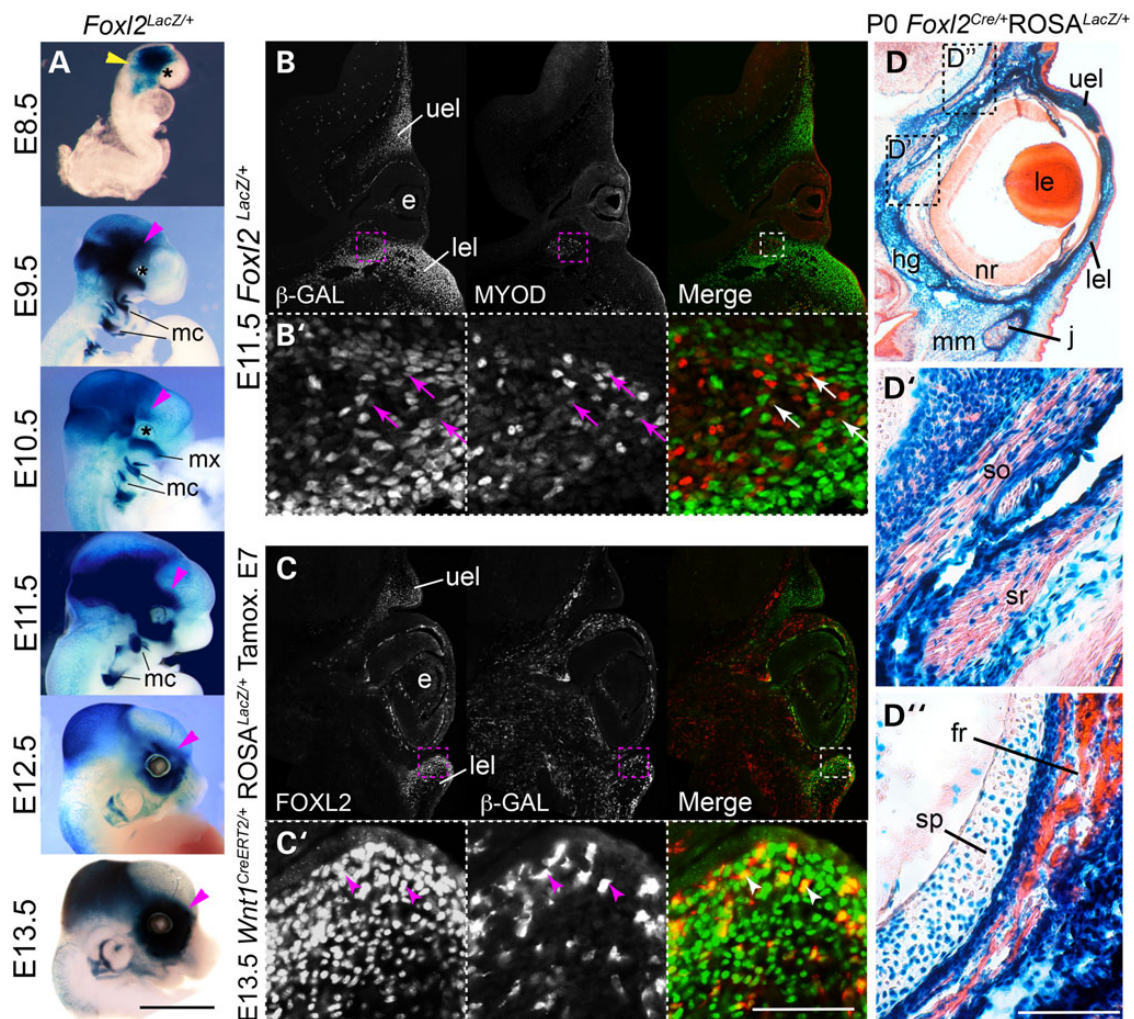


Figure 1. *Foxl2* is expressed by CNCCs and CMCs derivatives during development. (A) Whole mount X-GAL stainings of *Foxl2^{lacZ/+}* embryos from E8.5 to E13.5. At E8.5, β -Galactosidase (β -GAL) is expressed in a restricted region of the embryo at the level of the mesencephalon (yellow arrowhead) caudally to the eye precursor (black asterisk). From E9.5 to E13.5, β -GAL-expressing cells are observed in the periocular zone (pink arrowhead) and in the mesodermal core (mc) of the first and second pharyngeal arches and their derivatives. (B and B') β -GAL/MYOD immunohistochemistry on sections of an E11.5 *Foxl2^{lacZ/+}* embryo. β -GAL expression is detected in the periocular mesenchyme including the MYOD-positive oculomotor muscles of mesodermal origin (dashed squares in B, arrows in B'). (C and C') β -GAL/FOXL2 immunohistochemistry on sections of an E13.5 *Wnt1^{CreERT2/+} ROSA^{lacZ/+}* embryo. Tamoxifen injections at E7 and E7.5 induce a stable expression of lacZ in *Wnt1*-positive CNCCs in the periocular region at E13.5 (C). In the lower eyelid precursor (dashed square in C and C'), β -GAL positive cells also express *Foxl2* (arrowheads in C'). (D) X-GAL staining on sections of a *Foxl2^{Cre/+} ROSA^{lacZ/+}* newborn mouse. At P0, β -GAL-positive cells deriving from *Foxl2*-positive precursors are widely present in the periocular region. β -GAL-positive cells include CMCs derivatives: the upper eyelid (D), extraocular muscles (superior oblique and superior rectus in D) and the masticatory muscles (masseter muscle in D), and CNCCs derivatives: the lower eyelid (D), the frontal bone, the sphenoid cartilage (D') and the harderian gland (D). e, eye; fr, frontal bone; hg, harderian gland; j, jugal bone; le, lens; lel, lower eyelid; mc, mesodermal core; mm, masseter; mx, maxillary arch; nr, neural retina; sp, sphenoid; so, superior oblique; sr, superior rectus; uel, upper eyelid. Scale bars in A 150 μ m; in C' for B 250 μ m, for B' 30 μ m, for C 250 μ m and for C' 40 μ m; in D' for D 250 μ m and for D'-D'' 50 μ m.

At E13.5 and E15.5, other eye components, including the neural retina, the lens and the cornea, develop normally in *Foxl2*-KO fetuses. From E16.5 to P0, in the absence of *Foxl2*, the eye becomes gradually more affected. In particular, the cornea becomes thinner in mutant mice compared with controls (Fig. 2B2–C4, Supplementary Material, Fig. S2C–H). At birth, the eye of *Foxl2* mutants is abnormal, with a lens apposed to a thin cornea (Fig. 2C4), an affected retinal pigment epithelium, and malformed choroid and scleral layers (Supplementary Material, Fig. S2G–J).

Inactivation of *Foxl2* interferes with the development of extraocular muscles

Extraocular muscles include the six oculomotor muscles that control eye movement (Superior, Inferior, Lateral and Medial

rectus; Superior and Inferior oblique) and the muscles that control superior eyelid elevation: the *levator palpebrae superioris* (LPS) and the Müller's muscle (or superior tarsal muscle) (34), a small smooth muscle anchored to the LPS; eyelid closure is controlled by the *orbicularis oculi* muscle.

Human BPES is characterized by a dysplasia of the LPS leading to ptosis. Other ocular anomalies, such as strabismus and amblyopia, are often associated to BPES (4), suggesting possible defects of oculomotor muscles. To investigate the effect of *Foxl2* inactivation on extraocular muscle development, we identified striated and smooth muscles by immunostaining for DESMIN and Smooth Muscle Actin (α SMA) on sections from *Foxl2*-KO and control fetuses. At E13.5, oculomotor muscles, including the superior and inferior rectus and the superior oblique, are already present in control fetuses (Supplementary Material, Fig. S3A–F);

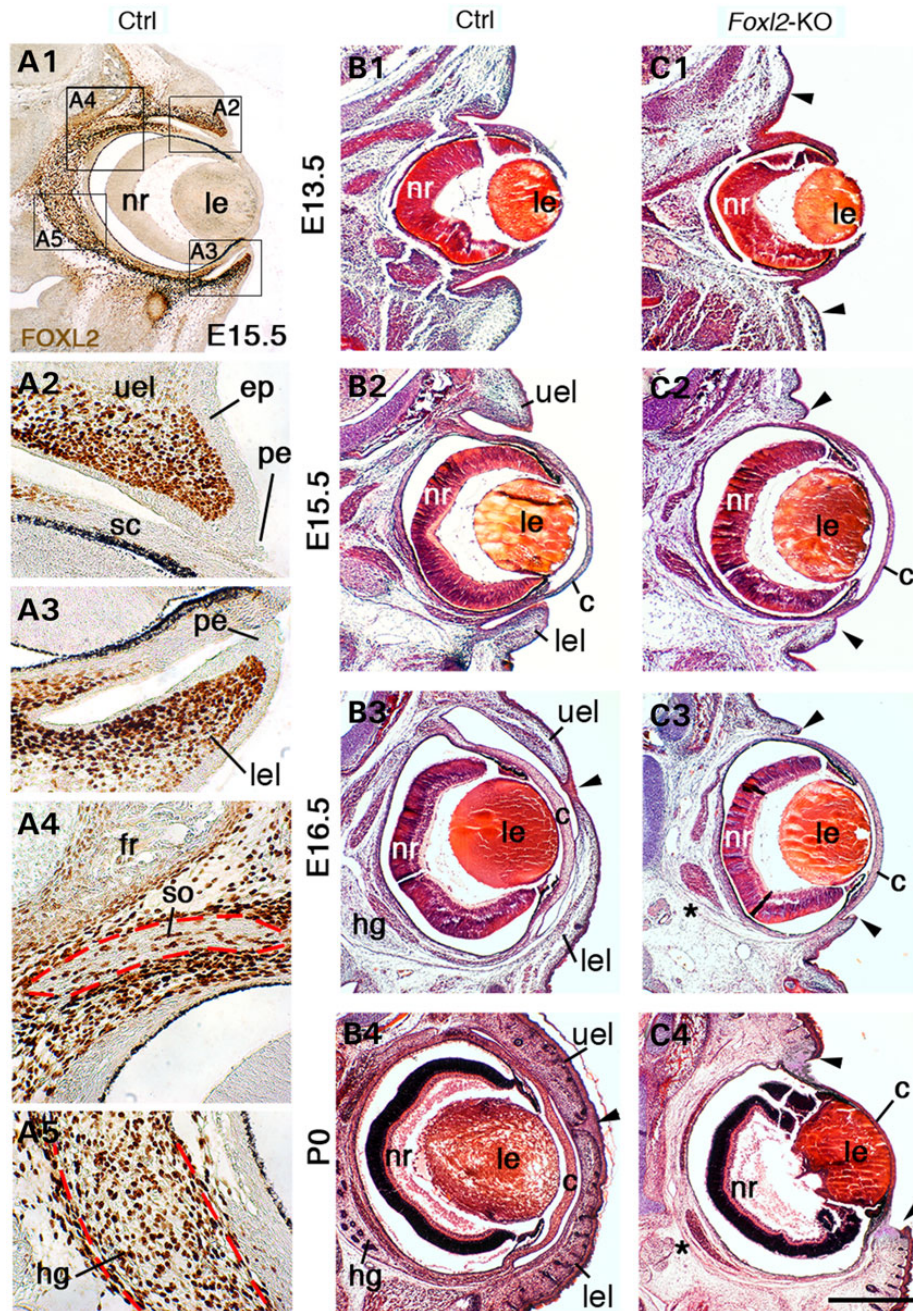


Figure 2. Foetal distribution of FOXL2 in the periocular region and eyelid developmental defect in *Foxl2*-KO mice. (A1–A5) FOXL2 immunohistochemistry in the periocular region on frontal sections of E15.5 normal foetuses. During eyelid development, *Foxl2* is expressed in the eyelid mesenchyme but not in the eyelid epithelium (ep) and extending periderm (pe) (A2–A3). *Foxl2* expressing cells are also observed in the frontal bone (fr) and in the oculomotor muscles such as the superior oblique (so) (A4). Moreover, *Foxl2* expression is detected in the harderian gland (A5). (B1–C4) Haematoxylin and eosin staining of frontal sections in the periocular region of control (B1–B4) and *Foxl2*-KO (C1–C4) foetuses from E13.5 to P0. At E13.5, the protruding eyelids are less developed in *Foxl2*-KO mice whereas the eye does not show differences compared with controls. Later, *Foxl2*-KO foetuses present a defect of eyelid outgrowth resulting in an open-eye phenotype at birth (black arrowheads, C2–C4). The eyelid closure anomaly in *Foxl2* mutants is associated to a thinning of the cornea. Note the absence of the harderian gland in the mutants (black asterisk C3–C4). c, cornea; ep, epithelium; fr, frontal bone; hg, harderian gland; le, lens; lel, lower eyelid; nr, neural retina; pe, peridermal cells; uel, upper eyelid; sc, sclera; so, superior oblique. Scale bar in C4 for A1 200 μ m, for A2–A4 50 μ m and for B1–C4 250 μ m

in *Foxl2*-KO embryos, these muscles are well differentiated but show different relative positions. In particular the superior oblique is posterior to the rectus muscles in *Foxl2*-KO mutants (Supplementary Material, Fig. S3G–L).

From E15.5 to P0, the oculomotor muscles, including the superior and inferior rectus, the *retractor bulbi* and the superior

oblique, are present in *Foxl2*-KO foetuses, but with abnormal morphologies, anchorage points and trajectories compared with controls (Fig. 3A–F), as better analysed by 3D reconstructions at P0 (Fig. 4). The abnormal eyelid development that we described in *Foxl2*-KO mice (Fig. 2) is accompanied by muscular defects. During normal development, a dramatic change occurs between

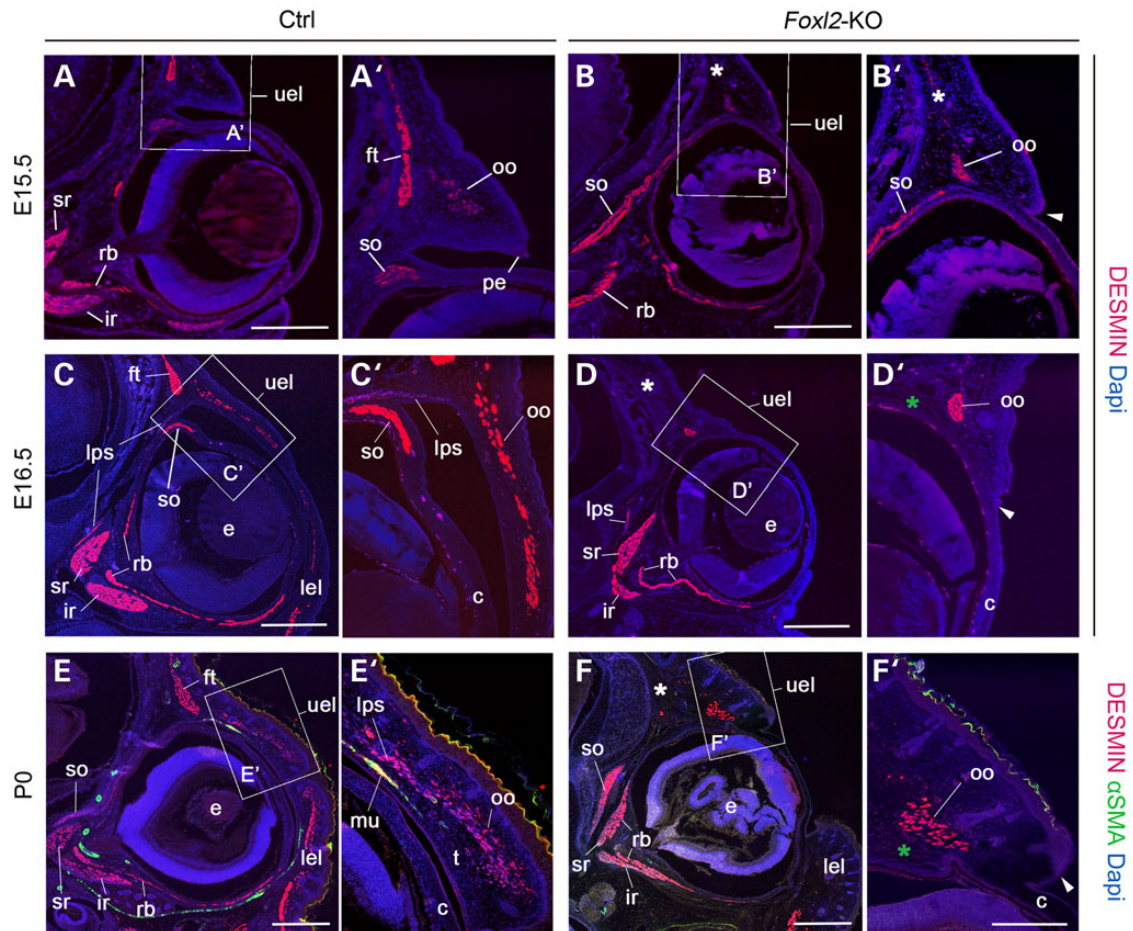


Figure 3. Defect of extraocular muscle development in *Foxl2*-KO foetuses. (A–D, A'–D') Immunofluorescent detection of the myogenic marker DESMIN (E and F, E' and F') and co-immunofluorescent localization of DESMIN and α SMA on frontal sections in the periocular region of control (A, C, E) and *Foxl2*-KO (B, D, F) foetuses from E15.5 to P0. From E15.5 to P0, DESMIN is present in the differentiated oculomotor muscles, including the superior and inferior rectus (sr and ir), the *retractor bulbi* (rb) and the superior oblique (so) (A, C, E). *Foxl2* mutants present morphological differences of oculomotor muscles (B, D, F) and an insertion defect of the superior oblique (B–D and B'–D'). From E15.5 to E16.5 in control foetuses at the eyelid level, the *orbicularis oculi* (oo) precursor follows the eyelid outgrowth to form the final muscle at P0. In parallel, the *levator palpebrae superioris* (lps) develops from E16.5 to P0 in the eyelid (C'–E') and the Müller muscle (mu) differentiates in the palpebral structure (E). In *Foxl2*-KO foetuses, the defect of eyelid formation (B', D', E' white arrowheads) leads to the presence of a muscle mass which corresponds to the not elongated *orbicularis oculi* (B, D, F, B', D', F'). *Foxl2* inactivation also provokes the absence of differentiated lps and Müller muscles in the hypoplastic eyelid (green asterisks D', F'). Note that the frontal muscle does not develop in *Foxl2* mutants (B, B', D white asterisks). c, cornea; ir, inferior rectus; lel, lower eyelid; lps, levator palpebrae superioris; mu, Müller muscle; oo, *orbicularis oculi*; rb, *retractor bulbi*; so, superior oblique; sr, superior rectus; uel, upper eyelid. Scale bars in A–F 250 μ m and in F' for A'–F' 100 μ m.

E15.5 and E16.5 in the size and shape of the *orbicularis oculi* (Fig. 3A'–C'), which parallels eyelid extension and forms the definitive eyelid muscle at P0 (Fig. 3E'). In contrast, in *Foxl2*-KO mice, the *orbicularis* persists as a hypoplastic muscular mass at the base of the undeveloped eyelid, and does not extend as in control animals (Fig. 3B', D' and F'). In addition, in normal animals, the LPS reaches the eyelid from E16.5 to P0. The LPS acts as the major eyelid opening muscle, while a second levator muscle, the Müller smooth muscle, binds to the superior tarsus, an elongated plate of connective tissue at the eyelid margin (Fig. 3E'). In mutants, we observed neither the LPS nor the Müller muscle at the level of the hypoplastic eyelid (Fig. 3F'). As an additional defect, *Foxl2*-KO foetuses lack a differentiated frontal muscle at all stages analysed (Fig. 3B, B', D and F, white asterisks).

We conclude that extraocular muscle malformations in *Foxl2*-KO mice begin early during craniofacial morphogenesis and that the most severely affected muscles are those involved in eyelid opening (LPS, Müller) and closure (*orbicularis oculi*).

Foxl2 invalidation in CNCCs recapitulates extraocular muscle defects of *Foxl2*-null mice

Given the complex spatial organization of the muscles in the eye region, we performed 3D segmentation of bones, cartilages and muscles in the periocular region of newborn mice, as shown in Figure 4A1–A1". As *Foxl2* is expressed both in CNCCs and in CMCs (Fig. 1), we wondered whether the origin of the defect was to be found in either of these populations or in both. To this end, we compared the periocular morphology of control newborn mice (Fig. 4A) with that observed in three different strains in which *Foxl2* was either: constitutively invalidated (*Foxl2*-KO, Fig. 4B), invalidated specifically in CNCCs (*Foxl2*-KO^{cncc}, Fig. 4D), or specifically in CMCs (*Foxl2*-KO^{mesoderm}, Fig. 4C). These selective deletions were obtained by crossing conditional *Foxl2* mutants with either *Foxl2*-Cre (constitutive inactivation), *Sox10*-Cre (CNCCs) or *Mesp1*-Cre (CMCs) mice. The invalidation of *Foxl2* either in CMCs or in

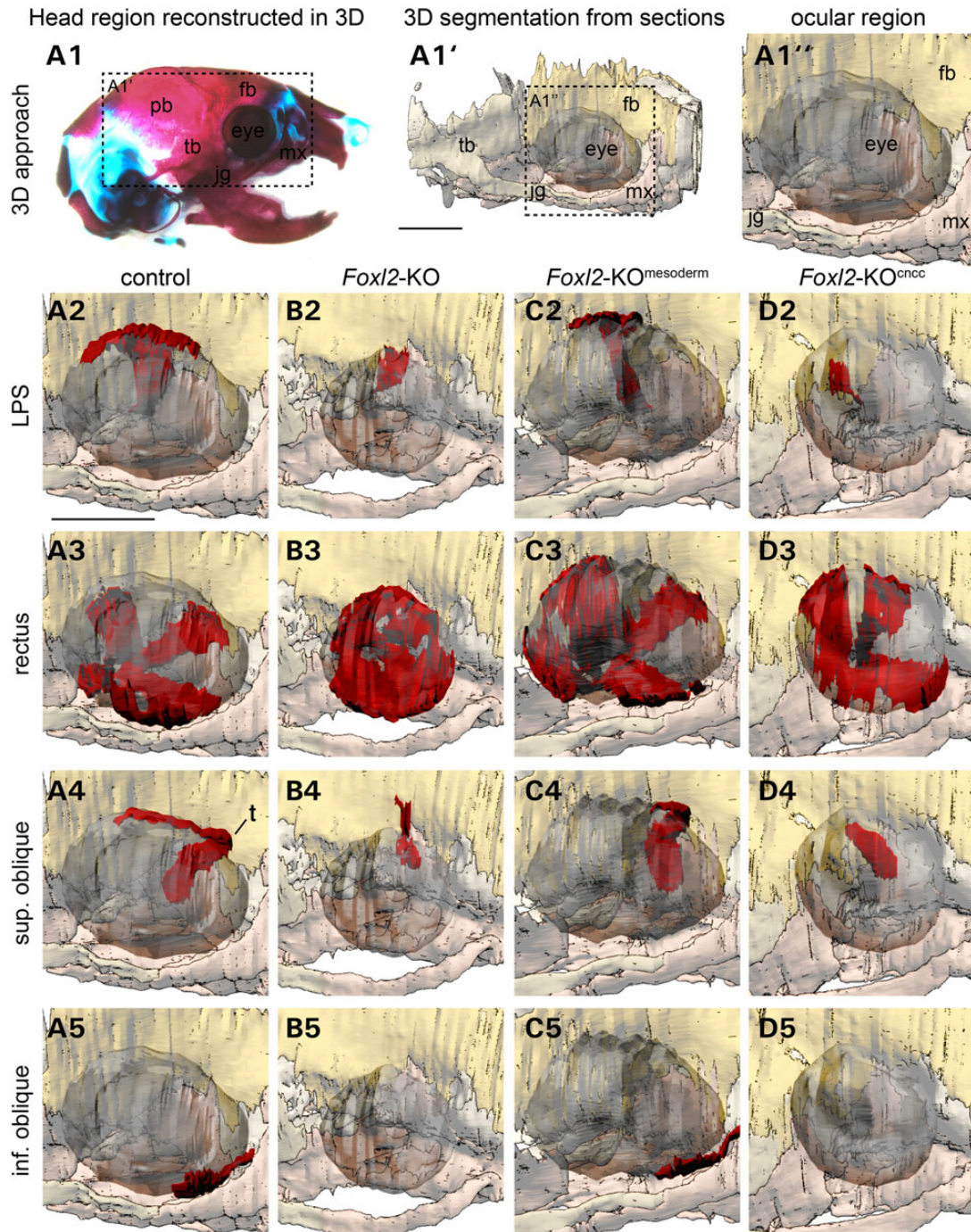


Figure 4. Extraocular muscle phenotype of *Foxl2*-KO, *Foxl2*-KO^{mesoderm} and *Foxl2*-KO^{cncc} mice at birth. (A1) Skeletal preparation of a newborn mouse head showing the region analysed by 3D segmentation (dashed rectangle); (A1', A1'') higher magnifications of the same region. (A2–D5) 3D segmentations of the orbital bones and extraocular muscles, including the LPS (line 2), the rectus (line 3) and the superior and inferior oblique (line 3–4) of control (A), *Foxl2*-KO (B), *Foxl2*-KO^{mesoderm} (C) and *Foxl2*-KO^{cncc} (D) at birth. The LPS reaches the superior eyelid in controls (A2), but not in the *Foxl2*-KO (B2). *Foxl2* invalidation in CNCCs (D2), but not in CMCs (C2) impairs LPS extension to the eyelid. (A3–D3) In all cases, four rectus muscles develop around the eye, despite different sclera (grey) morphologies. (A4–D4) In control animals (A4) the superior oblique muscle follows a complex trajectory reaching first the trochlear region (t) and then sharply changing of direction and contacts the superior part of the sclera. In *Foxl2*-KO mice, the superior oblique does not exit the trochlear region (B4). In *Foxl2*-KO^{mesoderm} mice (C4) the superior oblique follows a normal trajectory, although its contact zone with the sclera appears more focal. Whereas in *Foxl2*-KO^{cncc} (D4), the superior oblique is hypomorphic and fails to reach the sclera. (A5–D5) The inferior oblique muscle is present in control (A5) and *Foxl2*-KO^{mesoderm} (C5), but is absent in *Foxl2*-KO and *Foxl2*-KO^{cncc} mice (B5 and D5). Scale bars in A1 for A1–D1 and in A2 for A2–D5 1 mm.

CNCCs results in similar eyelid phenotypes that observed in mice constitutively deleted for *Foxl2* (Supplementary Material, Fig. S4).

We first analysed the morphology of the LPS, of particular interest for a BPES murine model. In *Foxl2*-KO mice, the LPS is present, but does not reach the upper eyelid as in controls and

Table 1. Summary of craniofacial muscles and bone defects observed in *Foxl2* mutants

Structures	Origin	<i>Foxl2</i> -KO	<i>Foxl2</i> -KO ^{mesoderm}	<i>Foxl2</i> -KO ^{cncc}
Eyelids	CMCs + CNCCs	–	–	–
LPS	CMCs	–	+/-	–
Rectus muscles		+/-	+	+/-
Superior/Inferior Oblique muscle		–	+/-	–
Presphenoid lesser wings		–	–	+
pmx/mx/jg	CNCCs	–	+	–

–, highly impaired or absent; +/-, reduced; +, not affected.

CMCs, cranial mesodermal cells; CNCCs, cranial neural crest cells; jg, jugal bone; LPS, levator palpebrae superioris; mx, maxillary bone; pmx, premaxillary bone.

attaches, instead, to the frontal bone (Fig. 4A2–B2). *Foxl2*-KO^{cncc} mice recapitulate the LPS phenotype of *Foxl2*-KO mice (Fig. 4D2). In contrast, in *Foxl2*-KO^{mesoderm} mice, the LPS retained its natural attachment point on the hypoplastic eyelids, but the lateral extension of the muscle was reduced (Fig. 4C2) compared with controls (Fig. 4A2).

In each genotype, the four branches of the rectus muscle were present (Fig. 4A3–D3) and well positioned around the sclera, however, in *Foxl2*-KO mice, the rectus muscles apparently covered a larger portion of the sclera surface.

The two oblique muscles, superior and inferior, were severely affected in *Foxl2*-KO mice. In control animals, the superior oblique muscle first reaches the trochlea and then turns sharply towards the sclera (Fig. 4A4). In *Foxl2*-KOs, only a small proximal segment of the superior oblique muscle persists, it is anchored to the frontal bone and does not reach the sclera (Fig. 4B4); the inactivation of *Foxl2* in CNCCs results in a similar phenotype (Fig. 4D4). *Foxl2* inactivation in CMCs results in a more subtle phenotype: the superior oblique connects the orbit to the sclera passing through the trochlea, although its anchorage to the sclera is more focal (Fig. 4C4). The inferior oblique is absent both in *Foxl2*-KO and in *Foxl2*-KO^{cncc} (Fig. 4B5 and D5), and has a normal morphology in *Foxl2*-KO^{mesoderm} mice (Fig. 4A5 and C5). The ocular muscle defects observed in the *Foxl2* mutants are summarized in Table 1.

Skull-bone defects in *Foxl2* mutant mice

Since *Foxl2* is expressed by CNCCs and CMCs (Fig. 1), which both give rise to craniofacial skeletal components (22), we analysed the bone phenotype of globally *Foxl2*-inactivated newborn mice. At birth, *Foxl2*-KO mice present ossification defects of the neurocranium components including the frontal, squamosal, parietal and interparietal bones (Fig. 5A1–B1). The analysis of the cranial base reveals that the lesser wings of the presphenoid are dramatically reduced compared with controls, while the basi-sphenoid and basioccipital bones are not affected (Fig. 5A2–A3 and B2–B3). *Foxl2*-KO mice also show a fusion of the maxillary bone with the premaxillary and jugal components (Fig. 5A4–A5 and B4–B5). In the reporter *Foxl2*^{Cre/+}ROSA^{LacZ/+} line at P0, the lesser wings of the presphenoid, the premaxillary, the maxillary and the jugal bones express *LacZ* (Supplementary Material, Fig. S1C–E) strongly suggesting the implication of *Foxl2* in the formation of the latter structures.

In *Foxl2*-KO^{mesoderm} mice, defects of the parietal and interparietal bones and of the lesser wing of the presphenoid bone

(CMCs-derived) are similar to that observed in *Foxl2*-KO mutants, the frontal bone and the maxillary components are not affected (CNCC derived) (Fig. 5C). In contrast, *Foxl2*-KO^{cncc} mice show a fusion of the maxillary, premaxillary and jugal bones (CNCCs-derived) associated to a normal presphenoid phenotype (Fig. 5D). The craniofacial bone defects observed in the *Foxl2* mutants are summarized in Table 1.

Discussion

The developmental origin underlying BPES facial malformations in humans has not been elucidated so far. Here, taking advantage of several mouse models of inactivation of *Foxl2*, we address the question of the *Foxl2* involvement in craniofacial development. We show that *Foxl2* is expressed by both CNCCs and CMCs, and is required for correct periocular muscle and bone morphogenesis. Using selective inactivation of *Foxl2* in CNCCs or in CMCs, we are able for the first time to demonstrate that, although both populations are important, CNCCs provide the topological cues needed for the morphogenesis of certain CMCs-derived extraocular muscles such as the LPS or the oblique muscles.

Foxl2 expression during craniofacial development

Although *Foxl2* expression during development of the mouse cephalic region has been reported (6,18,19,35), our results provide the first precise account of its spatio-temporal expression during craniofacial development. At E8.5/E9.5, *Foxl2* is expressed by most cells present in a restricted region of the head at the level of the mesencephalon including migratory CNCCs and CMCs. This restricted pattern of expression suggests that FOXL2 participates in the complex regulatory networks which define specific craniofacial regions, and that genetic mechanisms must exist to limit its expression anteriorly and posteriorly. At later stages, *Foxl2* expression is maintained in the mesodermal core of the first pharyngeal arch and in CNCCs of the maxillary arch, but is down regulated in CNCCs of the mandibular arch (Fig. 1A) possibly through a *Dlx5/6*-dependent mechanism (18,35). In the periocular region, *Foxl2* expression persists until eyelid fusion (E16.5); afterwards its level of expression in the eyelids diminishes to be hardly detectable at birth (30) (data not shown). The data suggest that *Foxl2* has a central role in early eyelid development and eyelid extension.

As eyelids are structures specific to gnathostomes (36), *Foxl2* might have been essential for their appearance during vertebrate evolution. Interestingly, *Foxl2* expression has been reported during foetal eyelid development of the dogfish and the goat (16,37), suggesting a conserved and ancestral role in eyelid development. The comparative analysis of *Foxl2* sequences in different species reveals that the *Foxl2* coding region is highly conserved in vertebrates (16,38). The analysis of *Foxl2* expression in the cephalic region of other species such as lampreys, amphioxus and hagfish might shed light on the evolutionary origin of eyelids in vertebrates.

Role of *Foxl2* in eye and eyelid development

We show that, at the ocular level, *Foxl2*-positive precursors contribute to form the sclera delimitating the corneal structure, the suspensory ligaments in contact to the ciliary body, the retinal pigment epithelium and the choroid coat apposed to the neural retina (Supplementary Material, Fig. S1F–H). In contrast *Foxl2*

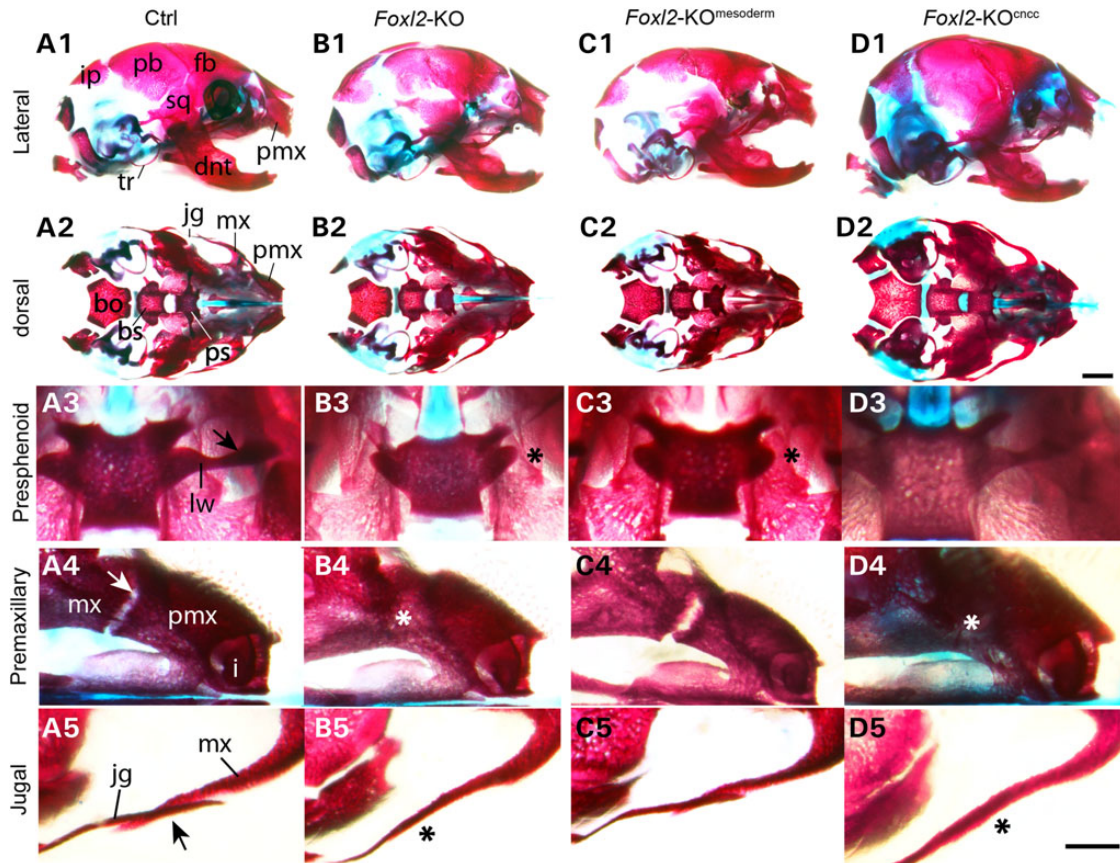


Figure 5. Craniofacial bone phenotype of *Foxl2*-KO, *Foxl2*-KO^{mesoderm} and *Foxl2*-KO^{cncc} mice at birth. Alcian blue/Alizarine red head skeletal preparations of a newborn control (A) and *Foxl2*-KO (B), *Foxl2*-KO^{mesoderm} (C) and *Foxl2*-KO^{cncc} (D) mice. In *Foxl2*-KO mutants, the lateral view of the skull shows ossification defects of the frontal (fb), squamosal (sq), parietal (pb) and interparietal (ip) bones compared with controls (A1–B1). The dorsal view of the cranial base of *Foxl2*-KO mice (B2) reveals that the lesser wings (lw) of the presphenoid bone (ps) are reduced (A3–B3, black arrow and asterisk). *Foxl2* inactivation also provokes a fusion of the maxillary bone (mx) with the premaxillary (pmx) (A4–B4, white arrow and asterisk) and jugal (jg) components (A5–B5, black arrow and asterisk). In *Foxl2*-KO^{mesoderm} mice, neurocranium and presphenoid bone defects are similar to those observed in *Foxl2*-KO mutants (C1–C3), whereas the maxillary components are not affected (C4–C5). In contrast, *Foxl2*-KO^{cncc} mice show a fusion of the maxillary, premaxillary and jugal bones associated to a normal presphenoid phenotype (D3–D5). Scale bars shown in D2 for A1–D2 1 mm and in D5 for A3–D5 500 μ m.

precursors do not participate to other eye components such as the lens, the neural retina and the cornea.

Foxl2-KO newborns are characterized by a dysgenesis of the retinal pigment epithelium, of the sclera and of the choroid layer (Supplementary Material, Fig. S2I and J), suggesting a direct role of *Foxl2* in the development of these structures. During early development, the cornea of *Foxl2*-KO mice is normal. At later stages, however, the cornea is much thinner and the whole eye morphology is affected (Fig. 2, Supplementary Material, Fig. S2C–H). Some data suggest that defects of eyelid closure might be at the origin of corneal anomalies (39,40); a closed eyelid is required for the development of ocular surface (40). The corneal degeneration observed in the *Foxl2*-KO newborns might be secondary to the failure of eyelid closure.

Our results reveal that *Foxl2*-positive precursors contribute to form periocular bones and muscles (Fig. 1D, Supplementary Material, Fig. S1B–E), and all structures constituting the core of the upper and lower eyelids, but not to the overlaying eyelid epidermis (Fig. 1D, Fig. 2A2–A3 and Supplementary Material, Fig. S1B and F). The data suggest an abnormal mesenchyme–epithelial interaction preventing peridermal extension during eyelid closure (Fig. 2 and Supplementary Material, Figs S2 and S4). The upper and lower eyelids have different embryonic origin (CMCs and

CNCCs, respectively) (41) and inactivation of *Foxl2* in either CMCs, CNCCs or both results in similar eyelid phenotypes in which eyelids are hypoplastic (Supplementary Material, Fig. S4). These findings suggest that the expression of *Foxl2* results in common developmental effects in cell populations of different origin.

Role of *Foxl2* in extraocular muscles development

In *Foxl2*-KO mice, the LPS and the SO muscles are present, but are severely affected: they do not present their natural points of attachment on the superior eyelid and on the sclera but display, instead, abnormal attachment points on the frontal bone (Figs 3D, F and 4B). This phenotype is reminiscent of human BPES in which the LPS is either absent or hypoplastic (2,3). Remarkably, although the LPS and the SO muscles derive from the mesoderm, these muscle present abnormal attachment points when *Foxl2* is invalidated only in CNCCs, but have normal connections when *Foxl2* is inactivated in CMCs (Fig. 4C and D, Table 1). In *Foxl2*-KO^{mesoderm} mice, ocular muscles such as the rectus, the LPS and the SO appear, however, reduced in size. In *Foxl2*-KO, the SO develops enough to contact at E15.5 its distal target, the sclera (Fig. 3B, B' and Supplementary Material, Fig. S2), although its trajectory is aberrant since the characteristic shape of this

muscle, through the CNCCs-derived trochlea, is absent (Fig. 3A,A' and B,B', Supplementary Material, Fig. S2). It is only in a second time, at E16.5, the eyelid closing stage, that the superior oblique loses its scleral attachment and binds to the frontal bone (Fig. 3D and D'), where it remains attached until birth (Figs 3E,F and 4). This indicates that the superior oblique does not require *Foxl2* for initial growth and extension.

In *Foxl2*-KO mice, the LPS never extends to the upper eyelid, but is attached to the frontal bone (Figs 3D,D' and 4B2). Since muscle-target recognition requires compatible adhesion cues (42), the absence of *Foxl2* in CNCCs could modify the identity of CNCCs-derivatives including tendons and bones leading to LPS and SO misrecognition of their targets.

Therefore, *Foxl2* expression in the mesoderm could have a cell autonomous, trophic role in determining muscle size, while its expression in CNCCs could be required to determine the positioning of extraocular muscles. Consistently with our finding, previous studies also implicated CNCCs in the development of craniofacial muscles by regulating their patterning, proliferation and differentiation (43,44). The absence of FOXL2 might change CNCCs properties, thereby preventing normal muscular development. Furthermore CNCCs might play an important role in the scaffolding of muscle attachment points, as they are progenitors of tendons, cranial bones and cartilages.

The inferior oblique is absent in *Foxl2*-KO and *Foxl2*-KO^{cncc} mice, suggesting that a CNCCs *Foxl2*-dependent signal is required for its development.

Our findings suggest complex pleiotropic roles of *Foxl2* in periocular muscle morphogenesis which could be differently modulated by the genetic background or by the type of *Foxl2* mutation, resulting in a large spectrum of phenotypes as observed BPES patients.

Role of *Foxl2* in skeletal development

Here we have shown that, beside muscular defects, inactivation of *Foxl2* induces also subtle craniofacial skeletal defects. For example, the jugal-maxillary and the maxillary-premaxillary junctions are absent in *Foxl2*-KO mice, resulting in the fusion of these bones (Fig. 5B4 and B5); these bones are CNCCs derivatives and, as expected, this phenotype is observed in *Foxl2*-KO^{cncc} mice (Fig. 5D4 and D5). Recently, craniofacial skeletal alterations partially overlapping those described in this report, have also been reported in mice carrying a piggyBac insertion mutation upstream of *Foxl2* resulting in a reduced, but not absent, expression of the gene (18). The skeletal alterations observed in piggyBac insertional mutants 14 days after birth include a maxillary-premaxillary dysmorphology which could derive from an embryonic defect similar to what we observe after *Foxl2* inactivation.

The lesser wings of the sphenoid derive from CMCs, and attach to the body of the sphenoid, which is a CNCCs derivative (22). Consistently with their embryonic origin, we observe the absence of the lesser wings of the sphenoid in *Foxl2*-KO^{mesoderm}, but not in *Foxl2*-KO^{cncc} mice (Fig. 5A3–D3).

As craniofacial bones are the targets for craniofacial muscle recognition, *Foxl2* seems to be implied in a complex dialogue between structures to determine their mutual positioning.

Analysis of cranial morphology of BPES patients has shown a relatively normal phenotype (4), however, minor features include a broad nasal bridge, low-set ears and a short philtrum (45).

Our phenotype has been analysed at birth, when, in the mouse, different skull bony elements are not yet fused. Although it might be difficult to compare our findings to those observed in BPES patients after bone fusion has taken place, our analysis

might pave the way for a better understanding of human craniofacial signs of the disease.

BPES aetiology: lessons from *Foxl2* conditional mouse mutants

Foxl2 mutant mice are good models of BPES ovarian phenotype (19,29); conditional inactivation of the gene in adult ovary has shown its importance to prevent transdifferentiation of an adult ovary to a testis (28). Although these mice present obvious craniofacial defects, no in-depth analysis of the origin of their facial phenotype has been reported. Here we show that *Foxl2* mutants recapitulate most of the facial signs of BPES and are, therefore, a useful tool to understand the aetiology of the morphological defects associated to the disease in particular, and the complex interplay of mammalian facial development in general.

The LPS phenotype in BPES is still controversial. It has been reported that BPES patients show absence or hypoplasia of LPS (3). In contrast, two other studies demonstrated that the posterior part of the LPS is present in the orbital region while the anterior LPS aponeurosis is dramatically disorganized at the eyelid level (2,46). These last observations are consistent with what we observe in *Foxl2* mutants. We show that the LPS is present in *Foxl2* mutants; however, it never enters the superior eyelid and has, instead, an anchorage point on the frontal bone (Figs 3 and 4).

Other ocular anomalies such as defects in optical acuity (associated with retina or lens defects, e.g. hyperopia or astigmatism), defects in oculomotor muscle functions (strabismus, nystagmus), defects in lower palpebral development and eyelid margin (euryblepharon, ectropion) and abnormal eye morphology (microphthalmos, microcornea, trabecular dysgenesis, optic disc coloboma) (4,11–15) are present at lower penetrance in BPES patients without, however, a proven molecular diagnosis. Our findings could help to understand the origin of rare BPES-associated phenotypic defects and determine their possible association with FOXL2. For example, abnormal oculomotor muscles (oblique muscles) might explain strabismus and nystagmus; lower palpebral formation and eyelid marginal defects could be a direct consequence of abnormal eyelid development; defects in optical acuity and abnormal eye morphology might be associated to dysgenesis of the sclera, of the suspensory ligaments of the ciliary body or of the choroid and retina which are involved in coloboma pathologies.

We show that *Foxl2* is expressed during craniofacial glandular development, including the lacrimal, salivary and harderian glands (Fig. 2 and Supplementary Material, Fig. S4). In mouse, the harderian gland produces the tear lipids, which prevent tear evaporation. The harderian gland is absent in humans (47), and tear lipids are produced by the meibomian glands. Interestingly, congenital lacrimal puncta anomalies and, more rarely, alacrima, associated or not to the absence of lacrimal glands are present in BPES patients (15,48). *Foxl2* inactivation in the mouse leads to the CNCCs-dependent absence of harderian glands (Fig. 2), while the lacrimal and the salivary glands are still present (data not shown) revealing a novel role of *Foxl2* on craniofacial glandular development.

The BPES facial phenotype is characterized by a defect of eyelid formation. During human development, eyelid fusion is completed at 9 weeks post-fertilization with subsequent reopening at 20 weeks (49). From 9 to 14 weeks, the *orbicularis oculi*, the LPS and the Müller muscles develop within the fused upper eyelids (49). Our data suggest that several aspects of the BPES facial phenotype might derive from a problem in palpebral development

during the eyelid closure/reopening process. It might, therefore, be interesting to analyse the eyelid closure/reopening process in human foetuses at risk of BPES through prenatal high-resolution ultrasound examination, which may permit detection of early abnormal eyelid development as early as 12–13 weeks.

Materials and Methods

Animals

Procedures involving animals were conducted in accordance with the directives of the European Community (council directive 86/609) and the French Agriculture Ministry (council directive 87–848, 19 October 1987, permissions 00782 to GL).

Foxl2 expression pattern was studied using a knockin Foxl2^{LacZ/+} stain (19). We also used Foxl2^{Cre/+}, bred with Rosa26^{lox-stop-lox-LacZ/+} (referred to as Rosa^{LacZ/+}) (50) mice to study Foxl2 expressing cell. Cranial neural crest cell lineage was also studied using an tamoxifen inducible Tg(Wnt1-Cre/ERT2)1Alj/J (Jackson Laboratory, referred to as Wnt1^{CreERT2/+}) bred with Rosa^{LacZ/+} mice. To induce recombination of the reporter in CNCCs, tamoxifen was injected intraperitoneally at E7 and E7.5 (Sigma-Aldrich, 1 mg in corn oil).

Cre expressing strains were used to induce cell population-specific Foxl2 inactivation when bred with a Foxl2^{lox/lox} mice strain (28). We targeted Foxl2 inactivation in CNCCs derivatives with Sox10^{Cre/+} mice (51) (Sox10^{Cre/+} Foxl2^{lox/lox}, referred to as Foxl2-KO^{CNCC} in the manuscript). Foxl2 was inactivated in head CMCs derivatives using Mesp1^{Cre/+} mice (52) (Mesp1^{Cre/+} Foxl2^{lox/lox} named Foxl2-KO^{mesoderm} in the manuscript). Foxl2^{Cre/+} mice were used to target all Foxl2 expressing cells (28) (Foxl2^{Cre/lox} referred to as Foxl2-KO in the manuscript). Alternatively, we used homozygous Foxl2^{LacZ/LacZ} mice as knockout Foxl2 newborn and embryos. No difference was observed in the phenotype between Foxl2^{Cre/lox} and Foxl2^{LacZ/LacZ} mice. Mice were maintained on a mixed (Black6/CD1) background.

Embryos up to E16.5 were fixed by overnight immersion in 4% paraformaldehyde at 4°C. Newborn mice were fixed by transcardiac perfusion with 4% paraformaldehyde and post-fixed for 2 h in the same fixative. After fixation, P0 mice heads were decalcified for 2 days with Jenkin's solution (4% hydrochloric acid 37%, 3% acetic acid, 10% chloroform, 10% dH₂O, 73% absolute ethanol). Samples were either cryoprotected in 30% sucrose, frozen and 20 µm thick cryostat sectioned, or dehydrated, embedded in paraffin and 12 µm thick microtome sectioned.

Immunohistochemistry

Sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies diluted in PBS 3% BSA 0.025% Triton (for anti-FOXL2) or in PBS 5% SVF (others) with the following dilutions: rabbit anti-DESMIN (Abcam AB15200, 1:800), rabbit anti-FOXL2 (Thermo Scientific PA1-802, 1:400), mouse anti-SMA (Sigma-Aldrich A5228, 1:4000), chicken anti-β-GAL (AVES labs, 1:2000), rabbit anti-MYOD (Santa-Cruz C-20:sc-304, 1:1200).

Immunohistochemistry was performed using standard protocols of the Dako Envision kit and the Dako ARK kit for DAB staining. Fluorescent immunohistochemistry were performed using species-specific fluorescent secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch; 1:500) that were incubated for 2 h at room temperature, and counterstained with Dapi (Sigma-Aldrich).

Skeletal preparation

P0 mice were placed in tap water O/N at 4°C, then in boiling water for 20–30 s in order to remove the skin and placed in ethanol 95%

O/N. They were washed in distilled water and immersed in the Alcian blue for 24 h to stain the cartilaginous structures. Samples were washed in 70% ethanol for 6–8 h, transferred to a solution of 1% KOH for 5 min and placed overnight in Alizarin red to stain bony structures. They were thinned in a solution of 1% KOH/glycerol 20% for 2 days and stored in a solution of 1% KOH/glycerol 2:8.

Histological staining and 3D segmentation

For histological staining, classical Haematoxylin and Eosin stainings were performed on E13.5 to P0 heads paraffin sections using stabilized haematoxylin and 1% aqueous eosin solutions (RAL diagnostics, France).

For 3D reconstruction, heads from P0 mice were fixed in Bouin's solution (Sigma, France), decalcified for 2 days with Jenkin's solution, paraffin embedded and sectioned as described. Complete sets of frontal sections were stained by Mallory's trichromic as in Everett and Miller (53) to reveal histological differences between tissues. Pictures from all the sections were aligned, piled and registered using the Fiji plug-in of NIH ImageJ 'Register Virtual Stack Slices' (http://fiji.sc/wiki/index.php/Register_Virtual_Stack_Slices). The aligned pictures from these sections were analysed with Mimics (Materialise, Belgium), a 3D segmentation software.

β-Galactosidase detection

For whole-mount LacZ expression analysis, embryos were immersed in 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-GAL) at 30°C for 24 h. Newborn heads were stained *in toto* after skin removal. For X-GAL staining on sections, heads were cryoprotected in 1× PBS-30% sucrose, then sectioned at 50 µm with a cryostat. β-Galactosidase activity was then revealed by immersing the free-floating sections in X-GAL at 30°C for 24 h. These sections were counterstained with a 1% aqueous eosin solution (RAL diagnostics, France)

Supplementary Material

Supplementary Material is available at HMG online.

Acknowledgements

We thank Margaret Buckingham for the gift of Mesp1-Cre mice, and William Richardson for the gift of Sox10-Cre mice. We thank Prof. Gérard Couly, Dr Yorick Gitton and Dr Anne Bachelot for discussions and suggestions. We thank Aurélie Hagneau, Océlia Fernandes, Anaïs Levoir, Marina Soulika and Aurélie Dipietro-maria for technical assistance.

Conflict of Interest statement. None declared.

Funding

E.H. was partly supported by a doctoral fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). This work was supported by the EU Consortia IDEAL (HEALTH-F2-2011-259679) and HUMAN (EU-FP7-HEALTH-602757), and by the National Museum of Natural History (ATM cycles biologiques 2014, ATM formes).

References

- Vignes, N.I. (1889) Epicanthus hereditaire. *Rev. Gen. Ophthal.*, **8**, 438.
- Decock, C.E., De Baere, E.E., Bauters, W., Shah, A.D., Delaey, C., Forsyth, R., Leroy, B.P., Kestelyn, P. and Claerhout, I. (2011) Insights into levator muscle dysfunction in a cohort of patients with molecularly confirmed blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome using high-resolution imaging, anatomic examination, and histopathologic examination. *Arch. Ophthalmol.*, **129**, 1564–1569.
- Dollfus, H., Stoetzel, C., Riehm, S., Lahlou Boukoffa, W., Bediard Boulaneb, F., Quillet, R., Abu-Eid, M., Speeg-Schatz, C., Francfort, J.J., Flament, J. et al. (2003) Sporadic and familial blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome: FOXL2 mutation screen and MRI study of the superior levator eyelid muscle. *Clin. Genet.*, **63**, 117–120.
- Chawla, B., Bhadange, Y., Dada, R., Kumar, M., Sharma, S., Bajaj, M.S., Pushker, N., Chandra, M. and Ghose, S. (2013) Clinical, radiologic, and genetic features in blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome in the Indian population. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **54**, 2985–2991.
- 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.
- Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Biscaglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S. et al. (2001) The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat. Genet.*, **27**, 159–166.
- De Baere, E., Dixon, M.J., Small, K.W., Jabs, E.W., Leroy, B.P., Devriendt, K., Gillerot, Y., Mortier, G., Meire, F., Van Maldergem, L. et al. (2001) Spectrum of FOXL2 gene mutations in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPES) families demonstrates a genotype-phenotype correlation. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 1591–1600.
- Beysen, D., De Paepe, A. and De Baere, E. (2009) FOXL2 mutations and genomic rearrangements in BPES. *Hum. Mutat.*, **30**, 158–169.
- Beysen, D., Raes, J., Leroy, B.P., Lucassen, A., Yates, J.R., Clayton-Smith, J., Ilyina, H., Brooks, S.S., 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. *Am. J. Hum. Genet.*, **77**, 205–218.
- D'Haene, B., Attanasio, C., Beysen, D., Dostie, J., Lemire, E., Bouchard, P., Field, M., Jones, K., Lorenz, B., Menten, B. et al. (2009) Disease-causing 7.4 kb cis-regulatory deletion disrupting conserved non-coding sequences and their interaction with the FOXL2 promoter: implications for mutation screening. *PLoS Genet.*, **5**, e1000522.
- Oley, C. and Baraitser, M. (1988) Blepharophimosis, ptosis, epicanthus inversus syndrome (BPES syndrome). *J. Med. Genet.*, **25**, 47–51.
- Beaconsfield, M., Walker, J.W. and Collin, J.R. (1991) Visual development in the blepharophimosis syndrome. *Br. J. Ophthalmol.*, **75**, 746–748.
- Vincent, A.L., Watkins, W.J., Sloan, B.H. and Shelling, A.N. (2005) Blepharophimosis and bilateral Duane syndrome associated with a FOXL2 mutation. *Clin. Genet.*, **68**, 520–523.
- Shah, B.M., Dada, T., Panda, A., Tanwar, M., Bhartiya, S. and Dada, R. (2013) Novel occurrence of axenfeld: Rieger syndrome in a patient with blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome. *Indian J. Ophthalmol.*, **63**, 358–360.
- Ng, J.K., Stout, A.U., Aaby, A.A. and Ng, J.D. (2014) Blepharophimosis syndrome with absent tear production. *Ophthalm. Plast. Reconstr. Surg.* (Epub ahead of print).
- Cocquet, J., Pailhoux, E., Jaubert, F., Servel, N., Xia, X., Panne-tier, M., De Baere, E., Messiaen, L., Cotinot, C., Fellous, M. et al. (2002) Evolution and expression of FOXL2. *J. Med. Genet.*, **39**, 916–921.
- Pisarska, M.D., Bae, J., Klein, C. and Hsueh, A.J. (2004) Forkhead l2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. *Endocrinology*, **145**, 3424–3433.
- Shi, F., Ding, S., Zhao, S., Han, M., Zhuang, Y., Xu, T. and Wu, X. (2014) A piggyBac insertion disrupts Foxl2 expression that mimics BPES syndrome in mice. *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 3792–3800.
- Schmidt, D., Ovitt, C.E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A.C. and Treier, M. (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*, **131**, 933–942.
- Couly, G., Grapin-Botton, A., Coltey, P., Ruhin, B. and Le Douarin, N.M. (1998) Determination of the identity of the derivatives of the cephalic neural crest: incompatibility between Hox gene expression and lower jaw development. *Development*, **125**, 3445–3459.
- LeLievre. (1978) Participation of neural crest derived cells in the genesis of the skull in birds. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **47**, 17–37.
- McBratney-Owen, B., Iseki, S., Bamforth, S.D., Olsen, B.R. and Morriss-Kay, G.M. (2008) Development and tissue origins of the mammalian cranial base. *Dev. Biol.*, **322**, 121–132.
- Noden, D.M. (1983) The embryonic origins of avian cephalic and cervical muscles and associated connective tissues. *Am. J. Anat.*, **168**, 257–276.
- Trainor, P.A., Tan, S.S. and Tam, P.P. (1994) Cranial paraxial mesoderm: regionalisation of cell fate and impact on craniofacial development in mouse embryos. *Development*, **120**, 2397–2408.
- Yoshida, T., Vivatbutsiri, P., Morriss-Kay, G., Saga, Y. and Iseki, S. (2008) Cell lineage in mammalian craniofacial mesenchyme. *Mech. Dev.*, **125**, 797–808.
- Trainor, P.A. (2013) *Neural Crest Cells: Evolution, Development and Disease*. Academic Press, Oxford, UK.
- Ellsworth, B.S., Egashira, N., Haller, J.L., Butts, D.L., Cocquet, J., Clay, C.M., Osamura, R.Y. and Camper, S.A. (2006) FOXL2 in the pituitary: molecular, genetic, and developmental analysis. *Mol. Endocrinol.*, **20**, 2796–2805.
- Uhlenhaut, N.H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A.C., Klugmann, C., Klasen, C., Holter, N. I. et al. (2009) Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, **139**, 1130–1142.
- Uda, M., Ottolenghi, C., Crisponi, L., Garcia, J.E., 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. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 1171–1181.
- Zhang, Y., Kao, W.W., Pelosi, E., Schlessinger, D. and Liu, C.Y. (2011) Notch gain of function in mouse periocular mesenchyme downregulates FoxL2 and impairs eyelid levator muscle formation, leading to congenital blepharophimosis. *J. Cell Sci.*, **124**, 2561–2572.
- Tan, S.S. and Morriss-Kay, G.M. (1986) Analysis of cranial neural crest cell migration and early fates in postimplantation rat chimaeras. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **98**, 21–58.

32. Noden, D.M. and Trainor, P.A. (2005) Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *J. Anat.*, **207**, 575–601.
33. Findlater, G.S., McDougall, R.D. and Kaufman, M.H. (1993) Eyelid development, fusion and subsequent reopening in the mouse. *J. Anat.*, **183**, 121–129.
34. Ng, S.K., Chan, W., Marcet, M.M., Kakizaki, H. and Selva, D. (2013) Levator palpebrae superioris: an anatomical update. *Orbit*, **32**, 76–84.
35. Jeong, J., Li, X., McEvelly, R.J., Rosenfeld, M.G., Lufkin, T. and Rubenstein, J.L. (2008) Dlx genes pattern mammalian jaw primordium by regulating both lower jaw-specific and upper jaw-specific genetic programs. *Development*, **135**, 2905–2916.
36. Walls, G.L. (1942) *The Vertebrate Eye and its Adaptive Radiation*. Hafner, New York.
37. Wotton, K.R., French, K.E. and Shimeld, S.M. (2007) The developmental expression of foxl2 in the dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Gene Expr. Patterns*, **7**, 793–797.
38. Cocquet, J., De Baere, E., Gareil, M., Pannetier, M., Xia, X., Fellous, M. and Veitia, R.A. (2003) Structure, evolution and expression of the FOXL2 transcription unit. *Cytogenet. Genome Res.*, **101**, 206–211.
39. Luetkeke, N.C., Qiu, T.H., Peiffer, R.L., Oliver, P., Smithies, O. and Lee, D.C. (1993) TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell*, **73**, 263–278.
40. Mongan, M., Wang, J., Liu, H., Fan, Y., Jin, C., Kao, W.Y. and Xia, Y. (2011) Loss of MAP3K1 enhances proliferation and apoptosis during retinal development. *Development*, **138**, 4001–4012.
41. Bildsoe, H., Loebel, D.A., Jones, V.J., Hor, A.C., Braithwaite, A. W., Chen, Y.T., Behringer, R.R. and Tam, P.P. (2013) The mesenchymal architecture of the cranial mesoderm of mouse embryos is disrupted by the loss of Twist1 function. *Dev. Biol.*, **374**, 295–307.
42. Swartz, M.E., Eberhart, J., Pasquale, E.B. and Krull, C.E. (2001) EphA4/ephrin-A5 interactions in muscle precursor cell migration in the avian forelimb. *Development*, **128**, 4669–4680.
43. Rinon, A., Lazar, S., Marshall, H., Buchmann-Moller, S., Neufeld, A., Elhanany-Tamir, H., Taketo, M.M., Sommer, L., Krumlauf, R. and Tzahor, E. (2007) Cranial neural crest cells regulate head muscle patterning and differentiation during vertebrate embryogenesis. *Development*, **134**, 3065–3075.
44. Heude, E., Bouhali, K., Kurihara, Y., Kurihara, H., Couly, G., Janvier, P. and Levi, G. (2010) Jaw muscularization requires Dlx expression by cranial neural crest cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 11441–11446.
45. De Baere, E. (2004) Blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus. In: Pagon, R.A., Adam, M.P., Ardinger, H.H., Bird, T. D., Dolan, C.R., Fong, C.T., Smith, R.J.H. and Stephens, K. (eds) GeneReviews®, Seattle, WA: University of Washington, Seattle.
46. Tronina, S.A., Bobrova, N.F. and Khrintenko, V.P. (2006) Clinical and anatomical substantiation of levator resection in the complex surgical treatment of BPES. *Orbit*, **25**, 5–10.
47. Albert, D.M., Frayer, W.C., Black, H.E., Massicotte, S.J., Sang, D. N. and Soque, J. (1986) The harderian gland: its tumors and its relevance to humans. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, **84**, 321–341.
48. Athappilly, G.K. and Braverman, R.S. (2009) Congenital alacrima in a patient with blepharophimosis syndrome. *Ophthalmic Genet.*, **30**, 37–39.
49. Byun, T.H., Kim, J.T., Park, H.W. and Kim, W.K. (2011) Timetable for upper eyelid development in staged human embryos and fetuses. *Anat. Rec.*, **294**, 789–796.
50. Soriano, P. (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.*, **21**, 70–71.
51. Matsuoka, T., Ahlberg, P.E., Kessar, N., Iannarelli, P., Dennehy, U., Richardson, W.D., McMahon, A.P. and Koentges, G. (2005) Neural crest origins of the neck and shoulder. *Nature*, **436**, 347–355.
52. Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S., Miyazaki, J. and Inoue, T. (1999) MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development*, **126**, 3437–3447.
53. Everett, M.M. and Miller, W.A. (1973) Adaptation of Mallory's trichrome stain to embryonic and fetal material. *Stain Technol.*, **48**, 5–8.

Discussion

1. FOXL2 EST REQUIS POUR L'ORGANISATION DU STROMA ET DU MYOMETRE

Les résultats de l'Article 1, montrent que *Foxl2* s'exprime dès la naissance dans les cellules du mésenchyme utérin. L'étude de lignage a montré que les cellules mésenchymateuses ayant exprimé *Foxl2* participent à la formation du stroma, de la couche profonde du myomètre interne et de la couche musculaire entourant les vaisseaux. L'absence de *Foxl2* dans l'utérus provoque une diminution de la couche stromale associée à une hypertrophie et une désorganisation du myomètre.

L'hypertrophie myométriale indique que l'absence de *Foxl2* provoquerait la différenciation anormale du stroma en cellule musculaire lisse. Ce qui indique que *Foxl2* pourrait permettre la segmentation entre le stroma et le myomètre en maintenant les cellules stromales dans un état indifférencié. Or, il a été vu dans une étude sur des cellules de ligné myoblastique C2C12, qu'un micro ARN spécifique miR-133a, très exprimé durant la différenciation musculaire, diminuait l'expression de *Foxl2* dans les progéniteurs myogéniques (Luo *et al.* 2015). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de *Foxl2* serait induite durant la différenciation musculaire. Dans une autre étude, il a été vu que l'activation constitutive de TGFBR1 provoquait aussi une hypertrophie et une désorganisation du myomètre. Chez ces souris, l'expression de nombreux gènes spécifiques aux muscles lisses est augmentée, suggérant que le signal induit par TGF β permettrait leur expression (Gao *et al.* 2015). La voie de transduction du signal de TGF β à son récepteur agit via les protéines SMADs qui agissent en tant que facteurs de transcription pour réguler un certain nombre de gènes cibles. Or, certaines protéines SMAD sont connues pour être des partenaires de *Foxl2*, notamment SMAD2, SMAD3 et SMAD4 qui forment des complexes avec *Foxl2* et jouent un rôle dans la régulation de l'expression de la Follistatine et de la sous-unité β de la FSH (FSH β) (Blount *et al.* 2009, Tan *et al.* 2010). L'interaction entre ces protéines pourrait également avoir lieu dans l'utérus et permettre de réguler la différenciation musculaire dans les cellules du mésenchyme utérin. Il serait intéressant de voir si l'inactivation de *Foxl2* sur des cellules en culture issues

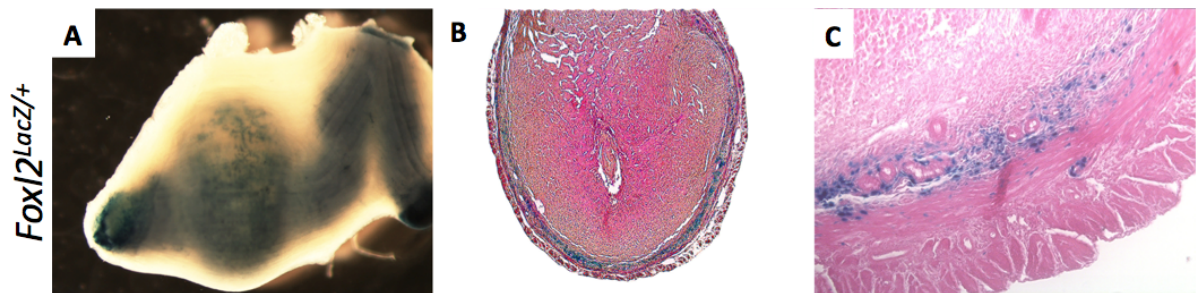
de mésenchyme utérin indifférencié permet la différenciation en cellules musculaires lisses. De même, il serait intéressant de voir si la présence de Foxl2 peut empêcher la différenciation musculaire de ces cellules et par quel mécanisme moléculaire il agit.

L'étude de lignage montre que les cellules musculaires entourant les vaisseaux proviennent de cellules ayant exprimé Foxl2. L'absence de la formation de ces couches musculaires dans les mutants conditionnels montre que la présence de Foxl2 permet la migration et l'attachement des CML aux vaisseaux. Foxl2 pourrait agir dans ce processus en favorisant la transcription de molécules d'adhésion ou la synthèse de certains composants de la matrice extracellulaire. Cette action de Foxl2 dans l'adhésion et la migration pourrait être plus générale que dans l'utérus et aussi permettre l'organisation de la couche profonde du myomètre interne qui est vue comme désorganisée chez les mutants conditionnels. D'autres données non publiées ont pu montrer que Foxl2 était aussi présent dans les vaisseaux d'autres organes, au niveau de la vascularisation du cerveau notamment, suggérant que ce rôle de Foxl2 serait plus général, et non spécifique à l'utérus. Il serait intéressant de regarder l'ensemble de la vascularisation des souris mutantes pour Foxl2 afin de voir si la formation des couches musculaires entourant les artères se fait normalement.

Notre étude a pu montrer un rôle essentiel de Foxl2 dans la maturation post-natale de l'utérus. Cependant, les causes provoquant le défaut d'implantation chez les mutant conditionnels restent indéterminées. Celles-ci pourraient être dues aux défauts de formation observés dans la couche musculaire interne. Chez la femme, il a été décrit que les contractions de cette couche musculaire, appelée aussi zone jonctionnelle (JZ), joue un rôle important dans l'invasion du trophoblaste (Brosens *et al.* 1995). Des études ont montré que les anomalies de cette couche musculaire sont reliées à des problèmes de fertilité et des pathologies utérines telle que l'adénomyose et l'endométriose, également associées à des problèmes de fertilité (Piver 2005, Tocci *et al.* 2008, Exacoustos *et al.* 2013). Mais l'infertilité pourrait également provenir d'un rôle plus tardif de Foxl2 chez l'adulte durant l'implantation.

En effet, durant mes travaux, j'ai aussi analysé le profil d'expression de Foxl2 pendant l'implantation embryonnaire. Cette étude montre que l'expression de *Foxl2* disparaît au niveau des sites d'implantation et plus particulièrement dans les cellules de la décidue (Figure 35). L'expression de *Foxl2* est maintenue dans les parties de l'utérus situées en dehors des sites d'implantation. Cela suggère que la suppression de l'expression de Foxl2 pourrait jouer

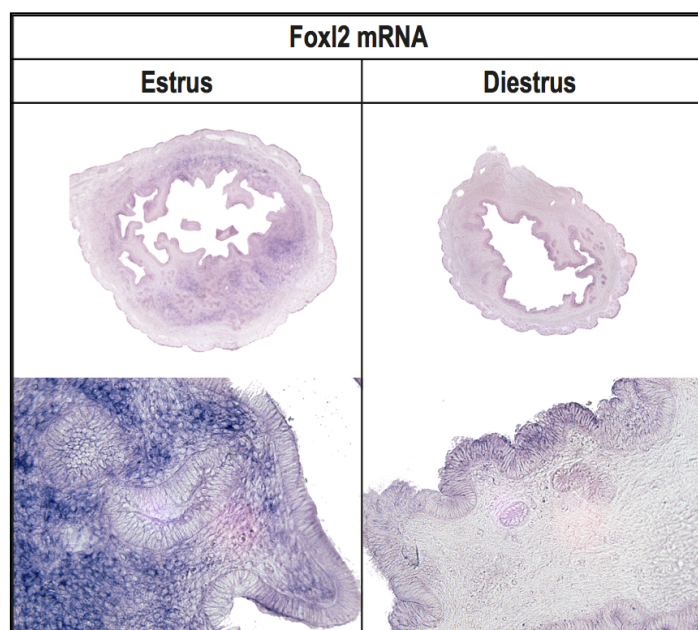
un rôle dans la décidualisation des cellules du stroma. Ceci conforterait notre hypothèse suggérant que l'expression de *Foxl2* est requise pour maintenir l'identité stromale. Une étude plus approfondie du rôle de *Foxl2* dans l'implantation est nécessaire. Il serait en particulier intéressant de voir quel moment précis de l'implantation est anormale chez les souris mutées pour *Foxl2*, et si le stroma de ces souris a la capacité de se différencier en décidue en procédant à une décidualisation artificielle (Deb *et al.* 2006).



➤ **Figure 35: Expression de *Foxl2* durant l'implantation à E5.5**

Coloration X-Gal d'un utérus de souris *Foxl2*^{LacZ/+} à E5.5. A : vue externe. B, C : Contre-coloration Eosine d'une coupe d'utérus au niveau d'un site d'implantation. On note que l'expression de *Foxl2* est absente du stroma entourant le blastocyste implanté. Une fine couche de cellules périphériques exprime encore *Foxl2*.

De plus, chez la souris, *Foxl2* est présent dans le stroma adulte. Chez la vache, il a été observé que l'expression de *Foxl2* est inhibée par le traitement à la P4 (Eozenou *et al.* 2012). Chez la femme, le niveau d'expression de *Foxl2* varie au cours du cycle menstruel où on observe une très forte expression durant la phase proliférative et une diminution de l'expression durant les phase sécrétoire précoce et tardive correspondant à l'élévation du taux de P4 (Talbi *et al.* 2006). J'ai pu voir que, chez la souris aussi, l'expression de *Foxl2* varie au cours du cycle œstral. Par la technique d'hybridations *in situ*, on peut voir que le transcrite de *Foxl2* n'est pas présent durant le dioestrus (Figure 36), ce qui semble correspondre à ce que l'on observe chez la vache et chez la femme. Comme chez la vache, chez la souris, *Foxl2* semble être régulé de manière négative par la P4. Il serait intéressant de voir si l'injection de P4 chez des souris adultes ovariectomisées diminue l'expression de *Foxl2*. De plus, il serait intéressant d'approfondir ces résultats en étudiant de plus près les sites de liaison du récepteur de la P4 sur le promoteur de *Foxl2* et de vérifier cela par des études d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).



➤ **Figure 36: Expression de Foxl2 durant le cycle œstral**

Hybridation in situ du transcrite de Foxl2 sur les coupes d'utérus durant l'œstrus et le diœstrus. On note une absence totale de marquage au niveau du stroma en diœstrus.

De manière intéressante, dans les ovaires, FOXL2 joue un rôle dans la balance prolifération-apoptose en régulant des gènes pro- (*ATF3*, *IER2*) et anti-apoptotiques (*TNFAIP3*, *IER3*, *BCL2A1*) (Batista *et al.* 2007). Cela suggère que Foxl2 pourrait être en jeu dans les mécanismes de prolifération qui ont lieu durant le cycle. Foxl2 pourrait avoir différents rôles dans l'utérus, que ce soit au niveau de la maturation post-natale, mais aussi durant le cycle et l'implantation embryonnaire.

Les femmes atteintes du syndrome BPES type I, en rapport avec des mutations à l'état hétérozygote du gène Foxl2, présentent des défauts de formation des paupières associés à une insuffisance ovarienne précoce (Verdin *et al.* 2012). Le phénotype est hétérogène, certaines femmes présentant un cycle menstruel normal ou au contraire une aménorrhée et une réduction de la fertilité (Crisponi *et al.* 2001, Fokstuen *et al.* 2003, Meduri *et al.* 2010). Actuellement, il n'existe pas d'étude spécifique de la fonction utérine des femmes BPES, mais des rares grossesses spontanées conduisant à la naissance ont été rapportées. Du fait de l'insuffisance ovarienne que ces femmes présentent, le projet parental peut passer par le don d'ovocytes. Il n'existe pas de données sur les résultats de fécondation *in vitro* après don d'ovocytes dans cette population spécifique. Ainsi, chez la femme, la perte de fonction hétérozygote de FOXL2 pourrait entraîner un phénotype utérin plus modéré que celui observé

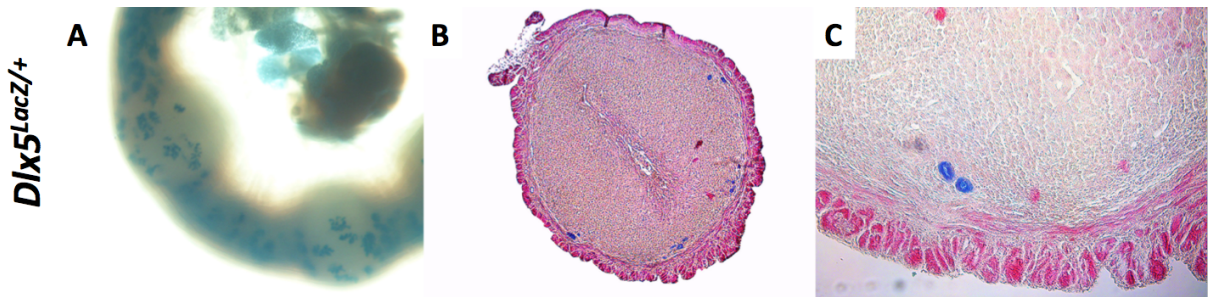
chez nos souris homozygotes mutantes. Néanmoins, il serait important d'analyser le développement myométrial de ces femelles en explorant plus précisément par IRM cette couche spécifiquement. Il pourrait être important de voir si l'endomètre de ces femelles, malgré la mutation de *FOXL2*, est apte à l'implantation.

2. DLX5 ET DLX6 PERMETTENT LA FORMATION DES GLANDES UTERINES UTERINE

Notre étude a permis de montrer que *Dlx5* et *Dlx6* jouent un rôle primordial dans la maturation post-natale de l'utérus. Leur expression dans l'épithélium permet la formation des GU et agissent sur la morphologie épithéliale.

Les invaginations anormalement larges observées chez les souris invalidées de façon conditionnelle dans l'utérus pour *Dlx5/6* suggèrent que l'expression de *Dlx5* et *Dlx6* n'est pas requise pour la formation précoce des invaginations à l'origine des GU, mais plutôt pour la fermeture de celles-ci. En effet, durant la formation des GU, le changement morphologique de l'épithélium est essentiel. On observe notamment une diminution de la surface du pôle apical, permettant la formation d'une structure tubulaire. *Dlx5* et *Dlx6* pourraient agir sur l'expression de certaines protéines importantes pour ces changements épithéliaux, notamment en régulant l'expression de *Foxa2*. De plus, on remarque que chez ces mutants les expressions de nombreux gènes épithéliaux comme *Msx1*, *Msx2*, *Wnt7a* et *Wnt11* sont dérégulées. *Msx1* et *Msx2* font partie d'un système de régulation complexe avec *Dlx5* et *Dlx6* impliqué dans l'organisation des bourgeons des pattes. Ces deux couples de gènes convergent dans la régulation de certains BMP (Bone morphogenetic protein) (Vieux-Rochas *et al.* 2013). Or les gènes *Msx1* et *Msx2* jouent un rôle clé durant l'implantation, notamment par l'inhibition de l'expression de *Wnt5a* dans l'épithélium, permettant une diminution de la polarité cellulaire nécessaire à l'implantation embryonnaire (Daikoku *et al.* 2011). Il se pourrait que la dérégulation des *Msx* observée dans nos souris invalidées pour *Dlx5/6* puisse être en cause dans le changement de morphologie épithéliale. De plus, il serait intéressant chez les souris invalidées pour *Dlx5/6* de voir le profil d'expression de molécules clés jouant un rôle dans la polarité épithéliale, telles que la E-cadherine, Scribble ou Vangl2.

Durant cette étude, nous avons mis en évidence le rôle de *Dlx5* et *Dlx6* dans le développement post-natal. Mais ces deux gènes sont également exprimés chez l'adulte et pourraient avoir un autre rôle durant les changements cycliques de l'utérus et durant l'implantation. Nous avons pu mettre en évidence qu'il n'y a pas de changement de la localisation de *Dlx5* ou *Dlx6* durant le cycle œstral, durant lequel ils restent exprimés au sein de l'épithélium luminal et glandulaire. Cependant, durant l'implantation à E5.5, *Dlx5* est présent au niveau des GU mais semble disparaître de l'épithélium luminal indiquant que son inactivation localisée pourrait avoir un rôle dans l'implantation et notamment dans le changement de morphologie épithéliale. Pour cela, il serait intéressant de suivre l'expression de *Dlx5* et *Dlx6* durant les différentes phases de l'implantation.



➤ **Figure 37: Expression de *Dlx5* durant l'implantation à E5.5**

*Coloration X-Gal d'un utérus de souris $Dlx5^{LacZ/+}$ à E5.5. A : vue externe. B, C : Contre-coloration Eosine d'une coupe d'utérus au niveau d'un site d'implantation. On note que l'expression de *Dlx5* est présente dans les GU mais disparaît de l'épithélium luminal.*

Les causes de l'infertilité décrites chez ces souris invalidées pour *Dlx5* et *Dlx6* restent à déterminer. Cependant, le fait de la quasi totale absence de GU chez ces souris, laisse supposer que la diminution des GU serait la cause de l'infertilité. Néanmoins, de manière surprenante, on observe une augmentation de l'expression du LIF chez les souris invalidées pour *Dlx5* et *Dlx6*, qui est normalement produit par les GU. Cette découverte pourrait suggérer que les GU, malgré leur anomalie morphologique, seraient capables de synthétiser ce facteur. Afin d'aller plus loin dans l'analyse, une étude du sécrétome serait nécessaire pour déterminer si les sécrétions sont comparables entre les deux génotypes.

L'endométriose, chez la femme, se caractérise par la présence de tissu utérin hors de la cavité utérine. Il a été observé sur les études de transcriptomes que DLX5 était sous exprimé de l'ordre de 15 fois dans les tissus endométriotiques comparés à l'endomètre sain (Hu *et al.*

2006). Dans notre étude, nous montrons que le profil d'expression de DLX5 change dans l'épithélium des tissus endométriaux où il est plus faible et disparate comparé à ce que l'on peut observer dans les GU. De plus, les épithéliums de ces lésions ont une morphologie très éloignée de ce que l'on observe dans les GU et rappelle celle observée chez les souris invalidées pour *Dlx5/6*, suggérant que l'expression de DLX5 serait aussi requise chez la femme pour maintenir la morphologie épithéliale.

L'interaction entre *Foxl2* et *Dlx5/6* participe au fonctionnement ovarien normal, comme cela a été décrit précédemment par notre groupe (Bouhali *et al.* 2011). Notre hypothèse de départ était que cette régulation mutuelle pouvait exister aussi au sein de l'utérus. Cependant, contrairement à l'ovaire, dans l'utérus, les types cellulaires exprimant *Dlx5/6* et *Foxl2* sont différents. *Dlx5* et *Dlx6* sont exprimés au niveau de l'épithélium et *Foxl2* au niveau du stroma. Ce qui suggère que des interactions sur leurs promoteurs respectifs sont peu probables. De plus, les phénotypes des souris inactivées pour *Dlx5/6* et *Foxl2* sont clairement différents. Nous n'observons aucune variation du nombre de glandes chez les souris *Pgr^{cre} / + ; Foxl2^{flox/flox}* et les souris *Pgr^{cre} / + ; Dlx5/6^{flox/flox}* ne montrent pas de changement de la couche myométriale. L'étude par qPCR de l'expression de *Dlx5* et *Dlx6* dans les KO conditionnels *Pgr^{cre} / + ; Foxl2^{flox/flox}* et de *Foxl2* dans les KO conditionnels *Pgr^{cre} / + ; Dlx5/6^{flox/flox}* ne montrent pas de différences du niveau d'expression, montrant bien que dans l'utérus, il n'existe pas d'interaction dans la régulation de ces deux facteurs de transcription.

Il est intéressant de noter cependant que *Dlx5* et *Dlx6*, tout comme *Foxl2*, sont exprimés dans tout l'axe reproducteur. Ces gènes s'expriment dans l'axe hypothalamo-hypophysaire, dans l'ovaire. Nos travaux démontrent pour la première fois, qu'ils sont aussi exprimés dans l'utérus.

Foxl2 est présent dans l'hypophyse, dans les cellules gonadotropes et thyrotropes où il permet la synthèse de la sous-unité β de la FSH (Tran *et al.* 2013). Dans les ovaires, *Foxl2* joue un rôle primordial dans la fonction et le maintien de l'identité ovarienne (Uda *et al.* 2004) (Uhlenhaut *et al.* 2009), et dans l'utérus, il permet le développement du stroma et du myomètre (Bellessort *et al.* 2015). *Dlx5* est exprimé par les cellules sécrétrices de GnRH de l'hypothalamus où la protéine *Dlx5* induit directement l'expression de la GnRH (Givens *et al.* 2005), dans l'ovaire *Dlx5* et *Dlx6* agissent sur la maturation folliculaire (Bouhali *et al.* 2011) et dans l'utérus *Dlx5* et *Dlx6* permettent le développement des glandes utérines essentielles à l'implantation embryonnaire.

Comme nous avons pu le voir, le rôle de ces gènes à chaque niveau du système reproducteur est très différent, mais se révèle être essentiel. Cette expression générale à tout le système suggère que la fonctionnalité de ces gènes est primordiale pour assurer la fonction reproductrice.

Bibliographie

Abrahamsohn, P. A. and T. M. Zorn (1993). "Implantation and decidualization in rodents." *J Exp Zool* **266**(6): 603-628.

Acampora, D., G. R. Merlo, L. Paleari, B. Zerega, M. P. Postiglione, S. Mantero, E. Bober, O. Barbieri, A. Simeone and G. Levi (1999). "Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene *Dlx5*." *Development* **126**(17): 3795-3809.

Aiman, J. and C. Smentek (1985). "Premature ovarian failure." *Obstet Gynecol* **66**(1): 9-14.

Arango, N. A., P. P. Szotek, T. F. Manganaro, E. Oliva, P. K. Donahoe and J. Teixeira (2005). "Conditional deletion of beta-catenin in the mesenchyme of the developing mouse uterus results in a switch to adipogenesis in the myometrium." *Dev Biol* **288**(1): 276-283.

Bachelot, A., A. Rouxel, N. Massin, J. Dulon, C. Courtillot, C. Matuchansky, Y. Badachi, A. Fortin, B. Paniel, F. Lecuru, M. A. Lefrere-Belda, E. Constancis, E. Thibault, G. Meduri, A. Guiochon-Mantel, M. Misrahi, F. Kuttann, P. Touraine and P.-G. S. Group (2009). "Phenotyping and genetic studies of 357 consecutive patients presenting with premature ovarian failure." *Eur J Endocrinol* **161**(1): 179-187.

Baron, D., F. Batista, S. Chaffaux, J. Cocquet, C. Cotinot, E. Cribiu, E. De Baere, Y. Guiguen, F. Jaubert, E. Pailhoux, M. Pannetier, D. Vaiman, B. Vigier, R. Veitia and M. Fellous (2005). "Foxl2 gene and the development of the ovary: a story about goat, mouse, fish and woman." *Reprod Nutr Dev* **45**(3): 377-382.

Bartol, F. F., A. A. Wiley, J. G. Floyd, T. L. Ott, F. W. Bazer, C. A. Gray and T. E. Spencer (1999). "Uterine differentiation as a foundation for subsequent fertility." *J Reprod Fertil Suppl* **54**: 287-302.

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." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(9): 3330-3335.

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.

Bellessort, B., A. Bachelot, E. Heude, G. Alfama, A. Fontaine, M. Le Cardinal, M. Treier and G. Levi (2015). "Role of Foxl2 in uterine maturation and function." *Hum Mol Genet*.

Benayoun, B. A., A. B. Georges, D. L'Hote, N. Andersson, A. Dipietromaria, A. L. Todeschini, S. Caburet, C. Bazin, M. Anttonen and R. A. Veitia (2011). "Transcription factor FOXL2 protects granulosa cells from stress and delays cell cycle: role of its regulation by the SIRT1 deacetylase." *Hum Mol Genet* **20**(9): 1673-1686.

Benson, G. V., H. Lim, B. C. Paria, I. Satokata, S. K. Dey and R. L. Maas (1996). "Mechanisms of reduced fertility in *Hoxa-10* mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal *Hoxa-10* expression." *Development* **122**(9): 2687-2696.

Besnard, V., S. E. Wert, W. M. Hull and J. A. Whitsett (2004). "Immunohistochemical localization of Foxa1 and Foxa2 in mouse embryos and adult tissues." *Gene Expr Patterns* **5**(2): 193-208.

Beverdam, A., G. R. Merlo, L. Paleari, S. Mantero, F. Genova, O. Barbieri, P. Janvier and G. Levi (2002). "Jaw transformation with gain of symmetry after *Dlx5/Dlx6* inactivation: mirror of the past?" *Genesis* **34**(4): 221-227.

Beysen, D., L. Moumne, R. Veitia, H. Peters, B. P. Leroy, A. De Paepe and E. De Baere (2008). "Missense mutations in the forkhead domain of FOXL2 lead to subcellular mislocalization, protein aggregation and impaired transactivation." *Hum Mol Genet* **17**(13): 2030-2038.

Beysen, D., J. Raes, B. P. Leroy, A. Lucassen, J. R. Yates, J. Clayton-Smith, H. Ilyina, S. S. Brooks, S. Christin-Maitre, M. Fellous, J. P. Fryns, J. R. Kim, P. Lapunzina, E. Lemyre, F. Meire, L. M. Messiaen, C. Oley, M. Splitt, J. Thomson, Y. Van de Peer, R. A. Veitia, A. De Paepe and E. De Baere (2005). "Deletions involving long-range conserved nongenic sequences upstream and downstream of FOXL2 as a novel disease-causing mechanism in blepharophimosis syndrome." Am J Hum Genet **77**(2): 205-218.

Blount, A. L., K. Schmidt, N. J. Justice, W. W. Vale, W. H. Fischer and L. M. Bilezikjian (2009). "FoxL2 and Smad3 coordinately regulate follistatin gene transcription." J Biol Chem **284**(12): 7631-7645.

Bouhali, K., A. Dipietromaria, A. Fontaine, S. Caburet, O. Barbieri, B. Bellessort, M. Fellous, R. A. Veitia and G. Levi (2011). "Allelic reduction of Dlx5 and Dlx6 results in early follicular depletion: a new mouse model of primary ovarian insufficiency." Hum Mol Genet **20**(13): 2642-2650.

Bouilly, J., R. A. Veitia and N. Binart (2014). "NOBOX is a key FOXL2 partner involved in ovarian folliculogenesis." J Mol Cell Biol **6**(2): 175-177.

Boulanger, L., M. Pannetier, L. Gall, A. Allais-Bonnet, M. Elzaiat, D. Le Bourhis, N. Daniel, C. Richard, C. Cotinot, N. B. Ghyselink and E. Pailhoux (2014). "FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat." Curr Biol **24**(4): 404-408.

Branford, W. W., G. V. Benson, L. Ma, R. L. Maas and S. S. Potter (2000). "Characterization of Hoxa-10/Hoxa-11 transheterozygotes reveals functional redundancy and regulatory interactions." Dev Biol **224**(2): 373-387.

Brody, J. R. and G. R. Cunha (1989). "Histologic, morphometric, and immunocytochemical analysis of myometrial development in rats and mice: I. Normal development." Am J Anat **186**(1): 1-20.

Brody, J. R. and G. R. Cunha (1989). "Histologic, morphometric, and immunocytochemical analysis of myometrial development in rats and mice: II. Effects of DES on development." Am J Anat **186**(1): 21-42.

Brosens, J. J., N. M. de Souza and F. G. Barker (1995). "Uterine junctional zone: function and disease." Lancet **346**(8974): 558-560.

Cadigan, K. M. and M. Peifer (2009). "Wnt signaling from development to disease: insights from model systems." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(2): a002881.

Caracciolo, A., A. Di Gregorio, F. Aniello, R. Di Lauro and M. Branno (2000). "Identification and developmental expression of three Distal-less homeobox containing genes in the ascidian *Ciona intestinalis*." Mech Dev **99**(1-2): 173-176.

Carson, D. D., I. Bagchi, S. K. Dey, A. C. Enders, A. T. Fazleabas, B. A. Lessey and K. Yoshinaga (2000). "Embryo implantation." Dev Biol **223**(2): 217-237.

Carta, L. and D. Sassoon (2004). "Wnt7a is a suppressor of cell death in the female reproductive tract and is required for postnatal and estrogen-mediated growth." Biol Reprod **71**(2): 444-454.

Cha, J., X. Sun and S. K. Dey (2012). "Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy." Nat Med **18**(12): 1754-1767.

Christin-Maitre, S. and R. Braham (2008). "[General mechanisms of premature ovarian failure and clinical check-up]." Gynecol Obstet Fertil **36**(9): 857-861.

Christin-Maitre, S., M. Pasquier, B. Donadille and P. Bouchard (2006). "[Premature ovarian failure]." Ann Endocrinol (Paris) **67**(6): 557-566.

Clark, J. H. and J. Gorski (1970). "Ontogeny of the estrogen receptor during early uterine development." Science **169**(3940): 76-78.

Cocquet, J., E. De Baere, M. Gareil, M. Pannetier, X. Xia, M. Fellous and R. A. Veitia (2003). "Structure, evolution and expression of the FOXL2 transcription unit." Cytogenet Genome Res **101**(3-4): 206-211.

Cocquet, J., E. Pailhoux, F. Jaubert, N. Servel, X. Xia, M. Pannetier, E. De Baere, L. Messiaen, C. Cotinot, M. Fellous and R. A. Veitia (2002). "Evolution and expression of FOXL2." J Med Genet **39**(12): 916-921.

Cohen, S. M., G. Bronner, F. Kuttner, G. Jurgens and H. Jackle (1989). "Distal-less encodes a homoeodomain protein required for limb development in *Drosophila*." Nature **338**(6214): 432-434.

Cooke, P. S., G. C. Ekman, J. Kaur, J. Davila, I. C. Bagchi, S. G. Clark, P. J. Dziuk, K. Hayashi and F. F. Bartol (2012). "Brief exposure to progesterone during a critical neonatal window prevents uterine gland formation in mice." Biol Reprod **86**(3): 63.

Crackower, M. A., S. W. Scherer, J. M. Rommens, C. C. Hui, P. Poorkaj, S. Soder, J. M. Cobben, L. Hudgins, J. P. Evans and L. C. Tsui (1996). "Characterization of the split hand/split foot malformation locus SHFM1 at 7q21.3-q22.1 and analysis of a candidate gene for its expression during limb development." Hum Mol Genet **5**(5): 571-579.

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.

Cunha, G. R. (1975). "The dual origin of vaginal epithelium." Am J Anat **143**(3): 387-392.

Cunha, G. R. (1976). "Stromal induction and specification of morphogenesis and cytodifferentiation of the epithelia of the Mullerian ducts and urogenital sinus during development of the uterus and vagina in mice." J Exp Zool **196**(3): 361-370.

Cunha, G. R., E. Battle, P. Young, J. Brody, A. Donjacour, N. Hayashi and H. Kinbara (1992). "Role of epithelial-mesenchymal interactions in the differentiation and spatial organization of visceral smooth muscle." Epithelial Cell Biol **1**(2): 76-83.

Cunha, G. R., P. Young and J. R. Brody (1989). "Role of uterine epithelium in the development of myometrial smooth muscle cells." Biol Reprod **40**(4): 861-871.

Daikoku, T., J. Cha, X. Sun, S. Tranguch, H. Xie, T. Fujita, Y. Hirota, J. Lydon, F. DeMayo, R. Maxson and S. K. Dey (2011). "Conditional deletion of *Msx* homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity." Dev Cell **21**(6): 1014-1025.

De Baere, E., D. Beysen, C. Oley, B. Lorenz, J. Cocquet, P. De Sutter, K. Devriendt, M. Dixon, M. Fellous, J. P. Fryns, A. Garza, C. Jonsrud, P. A. Koivisto, A. Krause, B. P. Leroy, F. Meire, A. Plomp, L. Van Maldergem, A. De Paepe, R. Veitia and L. Messiaen (2003). "FOXL2 and BPES: mutational hotspots, phenotypic variability, and revision of the genotype-phenotype correlation." Am J Hum Genet **72**(2): 478-487.

Deb, K., J. Reese and B. C. Paria (2006). "Methodologies to study implantation in mice." Methods Mol Med **121**: 9-34.

Decock, C. E., E. E. De Baere, W. Bauters, A. D. Shah, C. Delaey, R. Forsyth, B. P. Leroy, P. Kestelyn and I. Claerhout (2011). "Insights into levator muscle dysfunction in a cohort of patients with molecularly confirmed blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome using high-resolution imaging, anatomic examination, and histopathologic examination." Arch Ophthalmol **129**(12): 1564-1569.

Depew, M. J., T. Lufkin and J. L. Rubenstein (2002). "Specification of jaw subdivisions by *Dlx* genes." Science **298**(5592): 381-385.

Depew, M. J., C. A. Simpson, M. Morasso and J. L. Rubenstein (2005). "Reassessing the Dlx code: the genetic regulation of branchial arch skeletal pattern and development." J Anat **207**(5): 501-561.

Dey, S. K., H. Lim, S. K. Das, J. Reese, B. C. Paria, T. Daikoku and H. Wang (2004). "Molecular cues to implantation." Endocr Rev **25**(3): 341-373.

Dolle, P., M. Price and D. Duboule (1992). "Expression of the murine Dlx-1 homeobox gene during facial, ocular and limb development." Differentiation **49**(2): 93-99.

Dollfus, H., C. Stoetzel, S. Riehm, W. Lahlou Boukoffa, F. Bediard Boulaneb, R. Quillet, M. Abu-Eid, C. Speeg-Schatz, J. J. Francfort, J. Flament, F. Veillon and F. Perrin-Schmitt (2003). "Sporadic and familial blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome: FOXL2 mutation screen and MRI study of the superior levator eyelid muscle." Clin Genet **63**(2): 117-120.

Dunlap, K. A., J. Filant, K. Hayashi, E. B. Rucker, 3rd, G. Song, J. M. Deng, R. R. Behringer, F. J. DeMayo, J. Lydon, J. W. Jeong and T. E. Spencer (2011). "Postnatal deletion of Wnt7a inhibits uterine gland morphogenesis and compromises adult fertility in mice." Biol Reprod **85**(2): 386-396.

Ellsworth, B. S., A. T. Burns, K. W. Escudero, D. L. Duval, S. E. Nelson and C. M. Clay (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." Mol Cell Endocrinol **206**(1-2): 93-111.

Ellsworth, B. S., N. Egashira, J. L. Haller, D. L. Butts, J. Cocquet, C. M. Clay, R. Y. Osamura and S. A. Camper (2006). "FOXL2 in the pituitary: molecular, genetic, and developmental analysis." Mol Endocrinol **20**(11): 2796-2805.

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." Biol Reprod **87**(2): 32.

Exacoustos, C., D. Luciano, B. Corbett, G. De Felice, M. Di Feliciano, A. Luciano and E. Zupi (2013). "The uterine junctional zone: a 3-dimensional ultrasound study of patients with endometriosis." Am J Obstet Gynecol **209**(3): 248 e241-247.

Favier, B. and P. Dolle (1997). "Developmental functions of mammalian Hox genes." Mol Hum Reprod **3**(2): 115-131.

Fokstuen, S., S. E. Antonarakis and J. L. Blouin (2003). "FOXL2-mutations in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome (BPES); challenges for genetic counseling in female patients." Am J Med Genet A **117A**(2): 143-146.

Franco, C. A., S. Liebner and H. Gerhardt (2009). "Vascular morphogenesis: a Wnt for every vessel?" Curr Opin Genet Dev **19**(5): 476-483.

Franco, H. L., D. Dai, K. Y. Lee, C. A. Rubel, D. Roop, D. Boerboom, J. W. Jeong, J. P. Lydon, I. C. Bagchi, M. K. Bagchi and F. J. DeMayo (2011). "WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse." FASEB J **25**(4): 1176-1187.

Gao, Y., K. J. Bayless and Q. Li (2014). "TGFB1 is required for mouse myometrial development." Mol Endocrinol **28**(3): 380-394.

Gao, Y., S. Duran, J. P. Lydon, F. J. DeMayo, R. C. Burghardt, K. J. Bayless, L. Bartholin and Q. Li (2015). "Constitutive activation of transforming growth factor Beta receptor 1 in the mouse uterus impairs uterine morphology and function." Biol Reprod **92**(2): 34.

Garcia-Ortiz, J. E., F. Banda-Espinoza, J. C. Zenteno, L. M. Galvan-Uriarte, P. Ruiz-Flores and D. Garcia-Cruz (2005). "Split hand malformation, hypospadias, microphthalmia,

distinctive face and short stature in two brothers suggest a new syndrome." Am J Med Genet A **135**(1): 21-27.

Gendron, R. L., H. Paradis, H. M. Hsieh-Li, D. W. Lee, S. S. Potter and E. Markoff (1997). "Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in Hoxa-11 null mice." Biol Reprod **56**(5): 1097-1105.

Giltay, J. C., D. Wittebol-Post, H. van Bokhoven, P. M. Kastrop and M. T. Lock (2002). "Split hand/split foot, iris/choroid coloboma, hypospadias and subfertility: a new developmental malformation syndrome?" Clin Dysmorphol **11**(4): 231-235.

Givens, M. L., N. Rave-Harel, V. D. Goonewardena, R. Kurotani, S. E. Berdy, C. H. Swan, J. L. Rubenstein, B. Robert and P. L. Mellon (2005). "Developmental regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression by the MSX and DLX homeodomain protein families." J Biol Chem **280**(19): 19156-19165.

Gorfinkiel, N., L. Sanchez and I. Guerrero (1999). "Drosophila terminalia as an appendage-like structure." Mech Dev **86**(1-2): 113-123.

Goswami, D. and G. S. Conway (2005). "Premature ovarian failure." Hum Reprod Update **11**(4): 391-410.

Governini, L., P. Carrarelli, A. L. Rocha, V. D. Leo, A. Luddi, F. Arcuri, P. Piomboni, C. Chapron, L. M. Bilezikjian and F. Petraglia (2014). "FOXL2 in human endometrium: hyperexpressed in endometriosis." Reprod Sci **21**(10): 1249-1255.

Govoroun, M. S., M. Pannetier, E. Pailhoux, J. Cocquet, J. P. Brillard, I. Couty, F. Batellier and C. Cotinot (2004). "Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development." Dev Dyn **231**(4): 859-870.

Gray, C. A., F. F. Bartol, B. J. Tarleton, A. A. Wiley, G. A. Johnson, F. W. Bazer and T. E. Spencer (2001). "Developmental biology of uterine glands." Biol Reprod **65**(5): 1311-1323.

Hamatani, T., T. Daikoku, H. Wang, H. Matsumoto, M. G. Carter, M. S. Ko and S. K. Dey (2004). "Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(28): 10326-10331.

Hantak, A. M., I. C. Bagchi and M. K. Bagchi (2014). "Role of uterine stromal-epithelial crosstalk in embryo implantation." Int J Dev Biol **58**(2-4): 139-146.

Harris, S. E., A. L. Chand, I. M. Winship, K. Gersak, K. Aittomaki and A. N. Shelling (2002). "Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure." Mol Hum Reprod **8**(8): 729-733.

Hayashi, K., S. Yoshioka, S. N. Reardon, E. B. Rucker, 3rd, T. E. Spencer, F. J. DeMayo, J. P. Lydon and J. A. MacLean, 2nd (2011). "WNTs in the neonatal mouse uterus: potential regulation of endometrial gland development." Biol Reprod **84**(2): 308-319.

Heude, E., K. Bouhali, Y. Kurihara, H. Kurihara, G. Couly, P. Janvier and G. Levi (2010). "Jaw muscularization requires Dlx expression by cranial neural crest cells." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(25): 11441-11446.

Holland, N. D., G. Panganiban, E. L. Henyey and L. Z. Holland (1996). "Sequence and developmental expression of Amphidll, an amphioxus Distal-less gene transcribed in the ectoderm, epidermis and nervous system: insights into evolution of craniate forebrain and neural crest." Development **122**(9): 2911-2920.

Hsieh-Li, H. M., D. P. Witte, M. Weinstein, W. Branford, H. Li, K. Small and S. S. Potter (1995). "Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility." Development **121**(5): 1373-1385.

Hu, W. P., S. K. Tay and Y. Zhao (2006). "Endometriosis-specific genes identified by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction expression profiling of

endometriosis versus autologous uterine endometrium." *J Clin Endocrinol Metab* **91**(1): 228-238.

Jeong, J., X. Li, R. J. McEvelly, M. G. Rosenfeld, T. Lufkin and J. L. Rubenstein (2008). "Dlx genes pattern mammalian jaw primordium by regulating both lower jaw-specific and upper jaw-specific genetic programs." *Development* **135**(17): 2905-2916.

Jeong, J. W., I. Kwak, K. Y. Lee, T. H. Kim, M. J. Large, C. L. Stewart, K. H. Kaestner, J. P. Lydon and F. J. DeMayo (2010). "Foxa2 is essential for mouse endometrial gland development and fertility." *Biol Reprod* **83**(3): 396-403.

Jeong, J. W., H. S. Lee, H. L. Franco, R. R. Broaddus, M. M. Taketo, S. Y. Tsai, J. P. Lydon and F. J. DeMayo (2009). "beta-catenin mediates glandular formation and dysregulation of beta-catenin induces hyperplasia formation in the murine uterus." *Oncogene* **28**(1): 31-40.

Kaestner, K. H. (2010). "The FoxA factors in organogenesis and differentiation." *Curr Opin Genet Dev* **20**(5): 527-532.

Katila, T. (2001). "Sperm-uterine interactions: a review." *Anim Reprod Sci* **68**(3-4): 267-272.

King, A., S. E. Hiby, L. Gardner, S. Joseph, J. M. Bowen, S. Verma, T. D. Burrows and Y. W. Loke (2000). "Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors--a review." *Placenta* **21 Suppl A**: S81-85.

Kitajewski, J. and D. Sassoon (2000). "The emergence of molecular gynecology: homeobox and Wnt genes in the female reproductive tract." *Bioessays* **22**(10): 902-910.

Kobayashi, A. and R. R. Behringer (2003). "Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals." *Nat Rev Genet* **4**(12): 969-980.

Kosaki, K., T. Ogata, R. Kosaki, S. Sato and N. Matsuo (2002). "A novel mutation in the FOXL2 gene in a patient with blepharophimosis syndrome: differential role of the polyalanine tract in the development of the ovary and the eyelid." *Ophthalmic Genet* **23**(1): 43-47.

Kurita, T. (2011). "Normal and abnormal epithelial differentiation in the female reproductive tract." *Differentiation* **82**(3): 117-126.

Kurita, T., P. S. Cooke and G. R. Cunha (2001). "Epithelial-stromal tissue interaction in paramesonephric (Mullerian) epithelial differentiation." *Dev Biol* **240**(1): 194-211.

Langendijk, P., N. M. Soede and B. Kemp (2005). "Uterine activity, sperm transport, and the role of boar stimuli around insemination in sows." *Theriogenology* **63**(2): 500-513.

Lawson, C. T., C. Toomes, A. Fryer, M. J. Carette, G. M. Taylor, Y. Fukushima and M. J. Dixon (1995). "Definition of the blepharophimosis, ptosis, epicanthus inversus syndrome critical region at chromosome 3q23 based on the analysis of chromosomal anomalies." *Hum Mol Genet* **4**(5): 963-967.

Lim, H., L. Ma, W. G. Ma, R. L. Maas and S. K. Dey (1999). "Hoxa-10 regulates uterine stromal cell responsiveness to progesterone during implantation and decidualization in the mouse." *Mol Endocrinol* **13**(6): 1005-1017.

Lipschutz, J. H., H. Fukami, M. Yamamoto, M. Tatematsu, Y. Sugimura, M. Kusakabe and G. Cunha (1999). "Clonality of urogenital organs as determined by analysis of chimeric mice." *Cells Tissues Organs* **165**(2): 57-66.

Loffler, K. A., D. Zarkower and P. Koopman (2003). "Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: FOXL2 is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development." *Endocrinology* **144**(7): 3237-3243.

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

insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 11162-11166.

Luo, Y., X. Wu, Z. Ling, L. Yuan, Y. Cheng, J. Chen and C. Xiang (2015). "microRNA133a Targets Foxl2 and Promotes Differentiation of C2C12 into Myogenic Progenitor Cells." DNA Cell Biol **34**(1): 29-36.

Ma, L., G. V. Benson, H. Lim, S. K. Dey and R. L. Maas (1998). "Abdominal B (AbdB) Hoxa genes: regulation in adult uterus by estrogen and progesterone and repression in mullerian duct by the synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES)." Dev Biol **197**(2): 141-154.

Mark, M., F. M. Rijli and P. Chambon (1997). "Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis." Pediatr Res **42**(4): 421-429.

Masse, J., T. Watrin, A. Laurent, S. Deschamps, D. Guerrier and I. Pellerin (2009). "The developing female genital tract: from genetics to epigenetics." Int J Dev Biol **53**(2-3): 411-424.

Maxwell, G. L., G. V. Chandramouli, L. Dainty, T. J. Litzi, A. Berchuck, J. C. Barrett and J. I. Risinger (2005). "Microarray analysis of endometrial carcinomas and mixed mullerian tumors reveals distinct gene expression profiles associated with different histologic types of uterine cancer." Clin Cancer Res **11**(11): 4056-4066.

Meduri, G., A. Bachelot, C. Duflos, B. Bstandig, C. Poirot, C. Genestie, R. Veitia, E. De Baere and P. Touraine (2010). "FOXL2 mutations lead to different ovarian phenotypes in BPES patients: Case Report." Hum Reprod **25**(1): 235-243.

Mericskay, M., J. Kitajewski and D. Sassoon (2004). "Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus." Development **131**(9): 2061-2072.

Merlo, G. R., L. Paleari, S. Mantero, F. Genova, A. Beverdam, G. L. Palmisano, O. Barbieri and G. Levi (2002). "Mouse model of split hand/foot malformation type I." Genesis **33**(2): 97-101.

Merlo, G. R., B. Zerega, L. Paleari, S. Trombino, S. Mantero and G. Levi (2000). "Multiple functions of Dlx genes." Int J Dev Biol **44**(6): 619-626.

Miller, C., K. Degenhardt and D. A. Sassoon (1998). "Fetal exposure to DES results in de-regulation of Wnt7a during uterine morphogenesis." Nat Genet **20**(3): 228-230.

Miller, C., A. Pavlova and D. A. Sassoon (1998). "Differential expression patterns of Wnt genes in the murine female reproductive tract during development and the estrous cycle." Mech Dev **76**(1-2): 91-99.

Miller, C. and D. A. Sassoon (1998). "Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract." Development **125**(16): 3201-3211.

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." Hum Mol Genet **17**(7): 1010-1019.

Mulac-Jericevic, B., R. A. Mullinax, F. J. DeMayo, J. P. Lydon and O. M. Conneely (2000). "Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform." Science **289**(5485): 1751-1754.

Myojin, M., T. Ueki, F. Sugahara, Y. Murakami, Y. Shigetani, S. Aizawa, S. Hirano and S. Kuratani (2001). "Isolation of Dlx and Emx gene cognates in an agnathan species, *Lampetra japonica*, and their expression patterns during embryonic and larval development: conserved and diversified regulatory patterns of homeobox genes in vertebrate head evolution." J Exp Zool **291**(1): 68-84.

Nakamura, S., D. W. Stock, K. L. Wydner, J. A. Bollekens, K. Takeshita, B. M. Nagai, S. Chiba, T. Kitamura, T. M. Freeland, Z. Zhao, J. Minowada, J. B. Lawrence, K. M. Weiss and F. H. Ruddle (1996). "Genomic analysis of a new mammalian distal-less gene: *Dlx7*." *Genomics* **38**(3): 314-324.

Neidert, A. H., V. Virupannavar, G. W. Hooker and J. A. Langeland (2001). "Lamprey *Dlx* genes and early vertebrate evolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1665-1670.

Nishida, H., S. Miyagawa, M. Vieux-Rochas, M. Morini, Y. Ogino, K. Suzuki, N. Nakagata, H. S. Choi, G. Levi and G. Yamada (2008). "Positive regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression through the interaction between *Dlx* and GATA-4 for testicular steroidogenesis." *Endocrinology* **149**(5): 2090-2097.

Oh, S. J., J. H. Shin, T. H. Kim, H. S. Lee, J. Y. Yoo, J. Y. Ahn, R. R. Broaddus, M. M. Taketo, J. P. Lydon, R. E. Leach, B. A. Lessey, A. T. Fazleabas, J. M. Lim and J. W. Jeong (2013). "beta-Catenin activation contributes to the pathogenesis of adenomyosis through epithelial-mesenchymal transition." *J Pathol* **231**(2): 210-222.

Pailhoux, E., B. Vigier, S. Chaffaux, N. Serval, S. Taourit, J. P. Furet, M. Fellous, F. Grosclaude, E. P. Crihiu, C. Cotinot and D. Vaiman (2001). "A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats." *Nat Genet* **29**(4): 453-458.

Panganiban, G. and J. L. Rubenstein (2002). "Developmental functions of the Distal-less/*Dlx* homeobox genes." *Development* **129**(19): 4371-4386.

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.

Paria, B. C., W. Ma, J. Tan, S. Raja, S. K. Das, S. K. Dey and B. L. Hogan (2001). "Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(3): 1047-1052.

Paria, B. C., J. Tan, D. B. Lubahn, S. K. Dey and S. K. Das (1999). "Uterine decidual response occurs in estrogen receptor-alpha-deficient mice." *Endocrinology* **140**(6): 2704-2710.

Parr, B. A. and A. P. McMahon (1998). "Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires *Wnt-7a*." *Nature* **395**(6703): 707-710.

Piver, P. (2005). "[Uterine factors limiting ART coverage]." *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **34**(7 Pt 2): 5S30-35S33.

Porteus, M. H., A. Bulfone, R. D. Ciaranello and J. L. Rubenstein (1991). "Isolation and characterization of a novel cDNA clone encoding a homeodomain that is developmentally regulated in the ventral forebrain." *Neuron* **7**(2): 221-229.

Qiu, M., A. Bulfone, I. Ghattas, J. J. Meneses, L. Christensen, P. T. Sharpe, R. Presley, R. A. Pedersen and J. L. Rubenstein (1997). "Role of the *Dlx* homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of *Dlx-1*, *Dlx-2*, and *Dlx-1* and *-2* alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches." *Dev Biol* **185**(2): 165-184.

Qiu, M., A. Bulfone, S. Martinez, J. J. Meneses, K. Shimamura, R. A. Pedersen and J. L. Rubenstein (1995). "Null mutation of *Dlx-2* results in abnormal morphogenesis of proximal first and second branchial arch derivatives and abnormal differentiation in the forebrain." *Genes Dev* **9**(20): 2523-2538.

Ramathal, C. Y., I. C. Bagchi, R. N. Taylor and M. K. Bagchi (2010). "Endometrial decidualization: of mice and men." *Semin Reprod Med* **28**(1): 17-26.

Robinson, G. W. and K. A. Mahon (1994). "Differential and overlapping expression domains of Dlx-2 and Dlx-3 suggest distinct roles for Distal-less homeobox genes in craniofacial development." Mech Dev **48**(3): 199-215.

Robledo, R. F., L. Rajan, X. Li and T. Lufkin (2002). "The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development." Genes Dev **16**(9): 1089-1101.

Samee, N., V. Geoffroy, C. Marty, C. Schiltz, M. Vieux-Rochas, G. Levi and M. C. de Vernejoul (2008). "Dlx5, a positive regulator of osteoblastogenesis, is essential for osteoblast-osteoclast coupling." Am J Pathol **173**(3): 773-780.

Scherer, S. W., P. Poorkaj, H. Massa, S. Soder, T. Allen, M. Nunes, D. Geshuri, E. Wong, E. Belloni, S. Little and et al. (1994). "Physical mapping of the split hand/split foot locus on chromosome 7 and implication in syndromic ectrodactyly." Hum Mol Genet **3**(8): 1345-1354.

Schmidt, D., C. E. Ovitt, K. Anlag, S. Fehsenfeld, L. Gredsted, A. C. Treier and M. Treier (2004). "The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance." Development **131**(4): 933-942.

Schummer, M., I. Scheurlen, C. Schaller and B. Galliot (1992). "HOM/HOX homeobox genes are present in hydra (*Chlorohydra viridissima*) and are differentially expressed during regeneration." EMBO J **11**(5): 1815-1823.

Selski, D. J., N. E. Thomas, P. D. Coleman and K. E. Rogers (1993). "The human brain homeogene, DLX-2: cDNA sequence and alignment with the murine homologue." Gene **132**(2): 301-303.

Shi, F., S. Ding, S. Zhao, M. Han, Y. Zhuang, T. Xu and X. Wu (2014). "A piggyBac insertion disrupts Foxl2 expression that mimics BPES syndrome in mice." Hum Mol Genet.

Simeone, A., D. Acampora, M. Pannese, M. D'Esposito, A. Stornaiuolo, M. Gulisano, A. Mallamaci, K. Kastury, T. Druck, K. Huebner and et al. (1994). "Cloning and characterization of two members of the vertebrate Dlx gene family." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(6): 2250-2254.

Spencer, T. E., K. A. Dunlap and J. Filant (2012). "Comparative developmental biology of the uterus: insights into mechanisms and developmental disruption." Mol Cell Endocrinol **354**(1-2): 34-53.

Spencer, T. E., K. Hayashi, J. Hu and K. D. Carpenter (2005). "Comparative developmental biology of the mammalian uterus." Curr Top Dev Biol **68**: 85-122.

Stewart, C. L., P. Kaspar, L. J. Brunet, H. Bhatt, I. Gadi, F. Kontgen and S. J. Abbondanzo (1992). "Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor." Nature **359**(6390): 76-79.

Stock, D. W., D. L. Ellies, Z. Zhao, M. Ekker, F. H. Ruddle and K. M. Weiss (1996). "The evolution of the vertebrate Dlx gene family." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10858-10863.

Stuhmer, T., L. Puellas, M. Ekker and J. L. Rubenstein (2002). "Expression from a Dlx gene enhancer marks adult mouse cortical GABAergic neurons." Cereb Cortex **12**(1): 75-85.

Sumiyama, K., S. Q. Irvine and F. H. Ruddle (2003). "The role of gene duplication in the evolution and function of the vertebrate Dlx/distal-less bigene clusters." J Struct Funct Genomics **3**(1-4): 151-159.

Suzuki, K., R. Haraguchi, T. Ogata, O. Barbieri, O. Alegria, M. Vieux-Rochas, N. Nakagata, M. Ito, A. A. Mills, T. Kurita, G. Levi and G. Yamada (2008). "Abnormal urethra formation in mouse models of split-hand/split-foot malformation type 1 and type 4." Eur J Hum Genet **16**(1): 36-44.

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 (2006). "Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women." *Endocrinology* **147**(3): 1097-1121.

Tan, Y., M. Cheung, J. Pei, C. W. Menges, A. K. Godwin and J. R. Testa (2010). "Upregulation of DLX5 promotes ovarian cancer cell proliferation by enhancing IRS-2-AKT signaling." *Cancer Res* **70**(22): 9197-9206.

Tanwar, P. S., H. J. Lee, L. Zhang, L. R. Zukerberg, M. M. Taketo, B. R. Rueda and J. M. Teixeira (2009). "Constitutive activation of Beta-catenin in uterine stroma and smooth muscle leads to the development of mesenchymal tumors in mice." *Biol Reprod* **81**(3): 545-552.

Taylor, H. S., G. B. Vanden Heuvel and P. Igarashi (1997). "A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes." *Biol Reprod* **57**(6): 1338-1345.

Thibault, C. and M.-C. Levasseur (2001). *La Reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris, INRA : Ellipses.

Tocci, A., E. Greco and F. M. Ubaldi (2008). "Adenomyosis and 'endometrial-subendometrial myometrium unit disruption disease' are two different entities." *Reprod Biomed Online* **17**(2): 281-291.

Tran, S., X. Zhou, C. Lafleur, M. J. Calderon, B. S. Ellsworth, S. Kimmins, U. Boehm, M. Treier, D. Boerboom and D. J. Bernard (2013). "Impaired fertility and FSH synthesis in gonadotrope-specific Foxl2 knockout mice." *Mol Endocrinol* **27**(3): 407-421.

Uda, M., C. Ottolenghi, L. Crisponi, J. E. Garcia, M. Deiana, W. Kimber, A. Forabosco, A. Cao, D. Schlessinger and G. Pilia (2004). "Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development." *Hum Mol Genet* **13**(11): 1171-1181.

Udar, N., V. Yellore, M. Chalukya, S. Yelchits, R. Silva-Garcia, K. Small and B. Consortium (2003). "Comparative analysis of the FOXL2 gene and characterization of mutations in BPES patients." *Hum Mutat* **22**(3): 222-228.

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. Schutz, 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.

Vainio, S., M. Heikkila, A. Kispert, N. Chin and A. P. McMahon (1999). "Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling." *Nature* **397**(6718): 405-409.

Verdin, H. and E. De Baere (2012). "FOXL2 impairment in human disease." *Horm Res Paediatr* **77**(1): 2-11.

Vieux-Rochas, M., K. Bouhali, S. Mantero, G. Garaffo, P. Provero, S. Astigiano, O. Barbieri, M. F. Caratozzolo, A. Tullo, L. Guerrini, Y. Lallemand, B. Robert, G. Levi and G. R. Merlo (2013). "BMP-mediated functional cooperation between Dlx5;Dlx6 and Msx1;Msx2 during mammalian limb development." *PLoS One* **8**(1): e51700.

Walmer, D. K., M. A. Wrona, C. L. Hughes and K. G. Nelson (1992). "Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone." *Endocrinology* **131**(3): 1458-1466.

Wang, D., T. Kobayashi, L. Zhou and Y. Nagahama (2004). "Molecular cloning and gene expression of Foxl2 in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*." *Biochem Biophys Res Commun* **320**(1): 83-89.

Wang, H. and S. K. Dey (2006). "Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models." Nat Rev Genet **7**(3): 185-199.

Wang, Y., Y. Jia, P. Franken, R. Smits, P. C. Ewing, J. P. Lydon, F. J. DeMayo, C. W. Burger, J. Anton Grootegoed, R. Fodde and L. J. Blok (2011). "Loss of APC function in mesenchymal cells surrounding the Mullerian duct leads to myometrial defects in adult mice." Mol Cell Endocrinol **341**(1-2): 48-54.

Warot, X., C. Fromental-Ramain, V. Fraulob, P. Chambon and P. Dolle (1997). "Gene dosage-dependent effects of the Hoxa-13 and Hoxd-13 mutations on morphogenesis of the terminal parts of the digestive and urogenital tracts." Development **124**(23): 4781-4791.

Wood, G. A., J. E. Fata, K. L. Watson and R. Khokha (2007). "Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus." Reproduction **133**(5): 1035-1044.

Yamaguchi, T. P., A. Bradley, A. P. McMahon and S. Jones (1999). "A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo." Development **126**(6): 1211-1223.

Zerucha, T., T. Stuhmer, G. Hatch, B. K. Park, Q. Long, G. Yu, A. Gambarotta, J. R. Schultz, J. L. Rubenstein and M. Ekker (2000). "A highly conserved enhancer in the Dlx5/Dlx6 intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between Dlx genes in the embryonic forebrain." J Neurosci **20**(2): 709-721.

Zhao, Y. and S. S. Potter (2001). "Functional specificity of the Hoxa13 homeobox." Development **128**(16): 3197-3207.

Zlotogora, J., M. Sagi and T. Cohen (1983). "The blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome: delineation of two types." Am J Hum Genet **35**(5): 1020-1027.

Annexes

Posters

1. Présenté au Mouse Molecular Genetics Meeting 2013

« *Foxl2* is essential for uterine maturation and function »

Brice Bellessort, Anne Bachelot, Anastasia Fontaine, Aurélie Hagneau , Gladys Alfama and Giovanni Levi

2. Présenté au meeting annuel IDEAL 2012

« *Dlx5/6* and *Foxl2* in the uterus: regulation and function »

Brice Bellessort, Nicolas Narboux-Neme, Anastasia Fontaine, Aurélie Hagneau, Ocillia Fernandes, Leticia Imadalou, Elodie Lim, Yorick Gitton and Giovanni Levi

Brice Bellessort¹, Anne Bachelot^{1,2}, Anastasia Fontaine¹, Aurélie Hagneau¹, Oclia Fernandez¹, Gladys Alfama¹ and Giovanni Levi¹

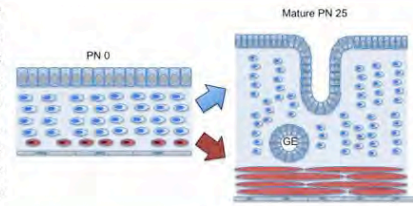
1) Evolution des Régulations Endocriniennes, UMR 7221 CNRS/MNHN, 7, rue Cuvier, Paris, France.

2) AP-HP, Department of Endocrinology and Reproductive Medicine, Pitié-Salpêtrière Hospital, UPMC, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

CONTEXT

Foxl2 codes for a forkhead/HNF3 transcription factor that displays a highly-conserved expression in the vertebrate ovary. *Foxl2* is known to contribute to ovarian development. After birth, it is essential for follicular maturation and for the maintenance of ovarian identity. Mutations in *FOXL2* are associated to blepharophimosis, ptosis, and canthus inversus syndrome (BPES), which is characterized by eyelid malformations. In certain forms, it is associated, in certain forms, by premature ovarian insufficiency. We have recently observed that *Foxl2* is not only expressed in the ovary, but also in other components of the female reproductive tract of most mammalian species, including, the endometrium, the oviduct and the oviduct. These observations might support the notion of a pleiotropic function of *Foxl2* on female reproduction.

The mouse uterus matures postnatally between PN5 and P25. At this stage important morphogenetic rearrangements take place including: stromal proliferation, myometrial differentiation and proliferation, endometrial adenogenesis. The newly-formed glands will then secrete the factors needed for embryo implantation.



1. *Foxl2* is expressed in the mouse uterus, from birth to adulthood.

We have followed *Foxl2* expression during critical morphologic changes of the uterus, namely during post natal maturation, the estrus cycle and implantation. To this end we have used three different approaches: *Foxl2-LacZ* reporter mice, immunohistochemistry and *in situ* hybridization.

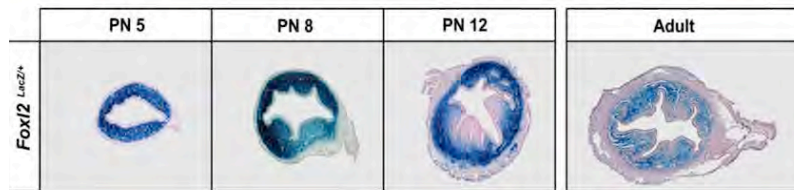


Fig. 1 X-Gal staining during post-natal uterine maturation in *Foxl2^{LacZ/+}* mice
Foxl2 is expressed in the mesenchymal layer which, later in development, gives rise to both stromal and muscular layers. After myogenic differentiation, *Foxl2-lacZ* expression persists only in the stroma.

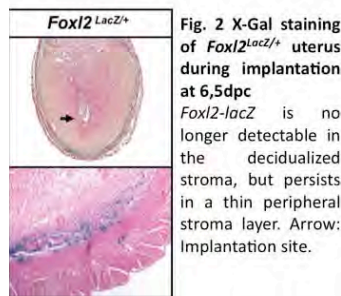
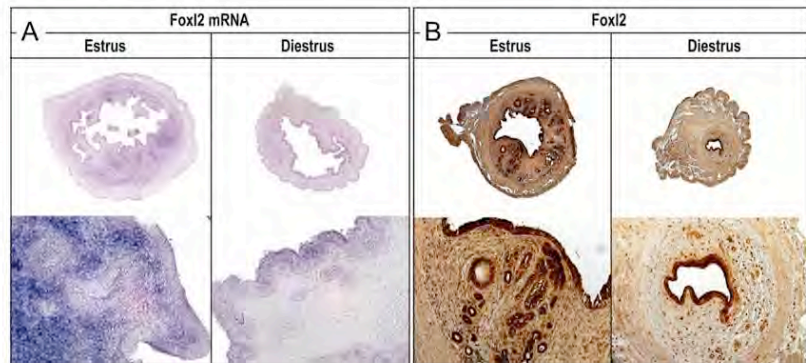


Fig. 2 X-Gal staining of *Foxl2^{LacZ/+}* uterus during implantation at 6,5dpc
Foxl2-lacZ is no longer detectable in the decidualized stroma, but persists in a thin peripheral stroma layer. Arrow: Implantation site.

Fig. 3 *Foxl2* expression during the estrous cycle in adult mice

A. *In-situ* hybridization in adult WT mice. *Foxl2* transcripts are detected in the stromal layer surrounding the uterine glands and, more weakly, in the uterine epithelia; *Foxl2* is no longer detectable in the stroma at diestrus.
B. Immunohistochemical staining for *Foxl2* in WT adult mice. At diestrus, there are fewer *Foxl2* positive cells in the stroma.



2. Phenotype resulting from uterine-specific inactivation of *Foxl2*

To delete *Foxl2* in the postnatal uterus, we have crossed *Foxl2^{lox/lox}* animals with *PGR-cre* mice in which the cre-recombinase is active in all uterine cells from PN 3 to adulthood.

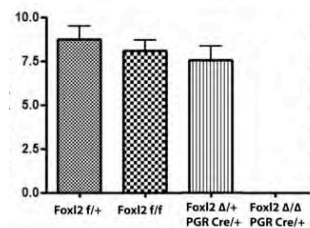


Fig. 4 *Foxl2^{Δ/Δ} PGR^{Cre/+}* mice are infertile
Compared to floxed animal or heterozygous conditional mutants mice, no litters was seen after vaginal plug in homozygous conditional mutants.



Fig. 5 3D reconstruction of lumen and glands volume in uterus.
Conditional mutants mice, present fewer glands with a different volume than WT animal. The lumen seems also bigger than control mice, with a different architecture. The analysis is still processing... Violet : uterine glands, yellow : lumen.

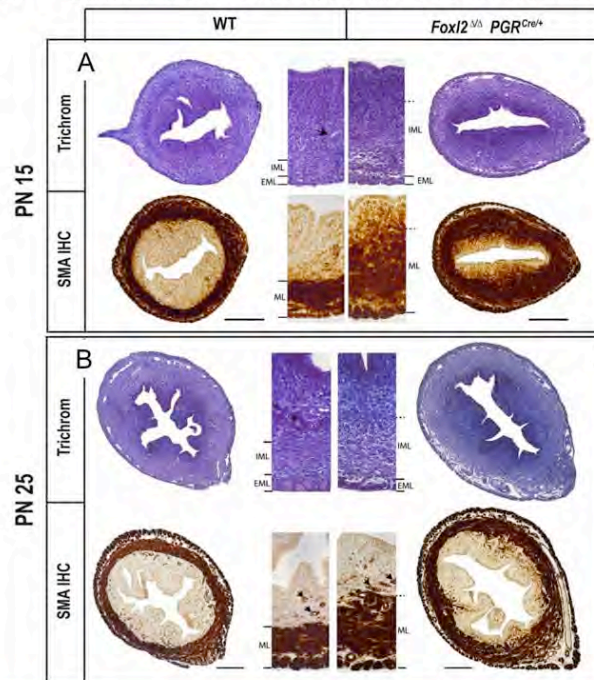
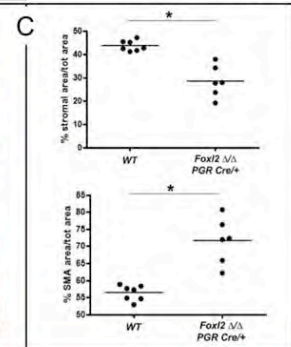


Fig. 5 Post-natal deletion of *Foxl2* in the mouse uterus induces a stromal differentiation defect and a switch to myometrial differentiation.
At PN 15 (A) and PN 25 (B), *Foxl2^{Δ/Δ} PGR^{Cre/+}* mice have a thinner stromal layer than WT animal (C : at PN 25, 15% decrease) and a disorganized myometrium that is bigger than WT (C : at PN 25, 15% increase). The limit between stroma and myometrium is not clearly defined as in the WT (A and B). EML: external myometrial layer, IML: inner myometrial layer. At PN15 (A), the phenotype is more clear as PN25 (B), where we observed a clear stromal layer, suggest a stromal proliferation defect place between these two stages in the mutant.



CONCLUSION

Foxl2 is expressed by the uterine stroma from birth to adulthood, its uterine-specific inactivation causes severe morphological defects and infertility. Absence of *Foxl2* in mesenchymal cells provokes an increased thickness of the muscular layer and a reduction of the stroma layer. As both stromal and muscular cells originate from early mesenchyme, these phenotypes could either be due to modification of stromal differentiation process or to abnormal muscular proliferation. *Foxl2* might control uterine differentiation determining stromal versus muscular identity. As a stroma layer is still present in the mutant, other factors should synergize with *Foxl2* in determining stromal differentiation. In mutant animals we still observe an inner stromal layer even in the absence of *Foxl2*, this suggests a heterogeneity within stromal cells. *Foxl2* is also expressed in the adult endometrium and is down regulated at diestrus and implantation. In both cases, the number of *Foxl2* positive cells decrease in the stroma. The infertility seen in conditional mutants might, therefore, be due either to the post natal maturation defect of stromal cells or to the role of *Foxl2* in the adult.

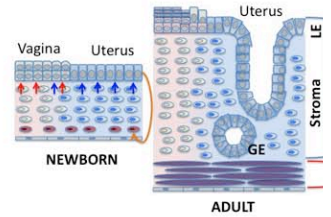
Brice Bellessort, Nicolas Narboux-Neme, Anastasia Fontaine, Aurélie Hagneau, Ocilia Fernandes, Leticia Imadalou, Elodie Lim, Yorick Gitton and Giovanni Levi

UMR7221 CNRS/MNHN, Evolution des Régulations Endocriniennes, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France.

CONTEXT

Vertebrate *Dlx* genes code for homeodomain transcription factors related to *Drosophila Distal-less (Dll)*. *Foxl2*, a downstream target *Dlx5*, is a forkhead/HNF3 transcription factor that plays a central role in ovarian development, follicular maturation and ovarian identity maintenance. We have shown that *Dlx5/6* and *Foxl2* regulate each other in follicular granulosa cells; this mutual regulation may be involved in the control of follicular maturation (Bouhali *et al.* 2011, Caburet *et al.* 2012).

We show that *Dlx5/6* and *Foxl2* are also expressed in the uterus suggesting that, in mammals, these genes might affect female reproduction at different levels. The mouse uterus matures postnatally between PN5 and PN15. At this stage important morphogenetic changes take place including: stromal proliferation, myometrial differentiation and proliferation, endometrial adenogenesis. The newly formed glands will then secrete the factors needed for embryo implantation.



1. Expression Profile of *Dlx5/6* and *Foxl2* in the uterus during post-natal maturation and in the adult.

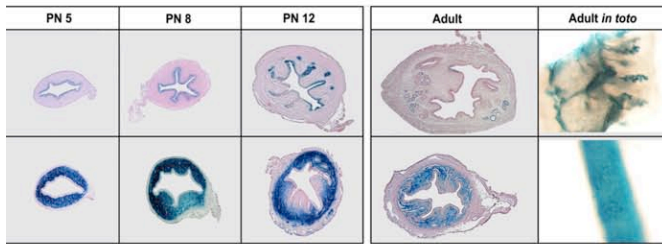


Fig. 1 X-GAL staining during post-natal uterine maturation in *Dlx5^{lacZ/+}* and *Foxl2^{lacZ/+}* mice. *Dlx5* is expressed in uterine epithelia from PN5 to adulthood. *Foxl2* is expressed in the mesenchymal layer which is the origin of the stromal and muscular layers. After myogenic differentiation, *Foxl2-lacZ* persists only in the stroma.

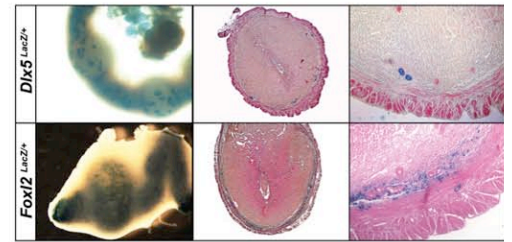


Fig. 2 X-GAL staining of *Dlx5^{lacZ/+}* and *Foxl2^{lacZ/+}* uterus during implantation at 6,5dpc. *Foxl2-lacZ* is no longer detectable in the decidualized stroma, while *Dlx5-lacZ* persists in the epithelium.

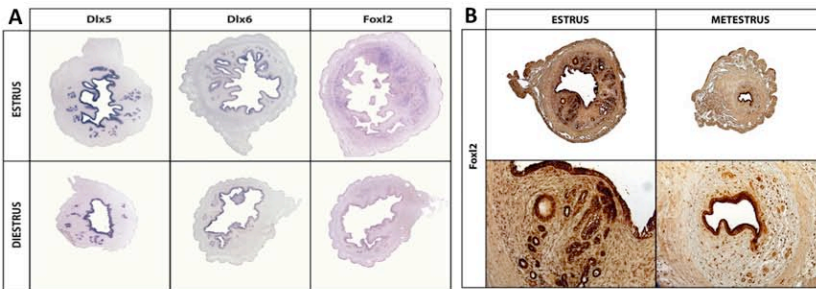


Fig. 3 *Dlx5*, *Dlx6* and *Foxl2* during the estrous cycle. A. *In-situ* hybridization in adult WT mice. *Dlx5* and *Dlx6* have the same transcript localization in epithelial cells. *Foxl2* transcripts are localized both in the epithelium and in the stromal layer surrounding the uterine glands; *Foxl2* is no longer detectable in the stroma as diestrus. B. Immunohistochemical staining for *Foxl2* in WT adult mice.

2. Conditional deletion of *Dlx5* and *Foxl2*

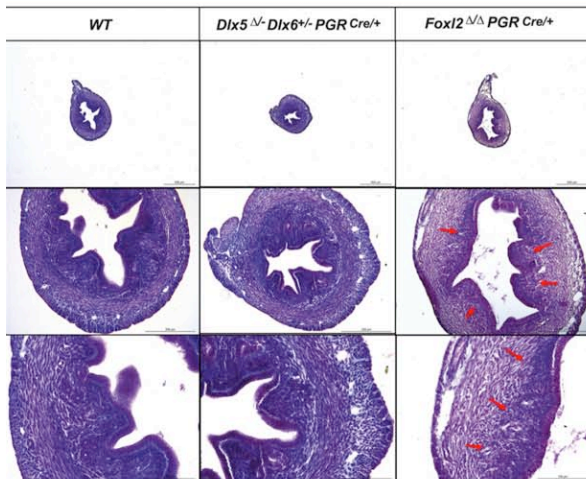
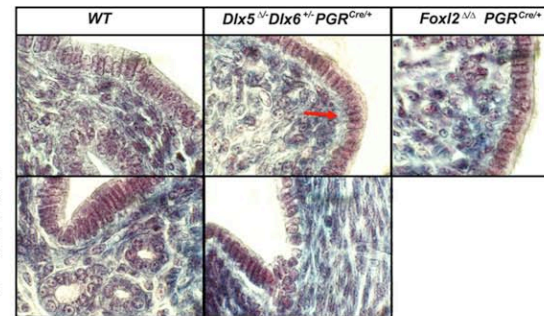


Fig. 4 Conditional deletion in the mouse uterus of *Dlx5*, *Dlx6* and *Foxl2* (PN28). The mice *Dlx5^Δ/Dlx6^{+/-} PGR^{Cre/+}* present a smaller uterus than wild type animals, but global organization seems conserved. *Foxl2^{Δ/Δ} PGR^{Cre/+}* mice have no uterine glands, a thinner stromal layer than WT animal and a desorganized myometrium. The limit between stroma and myometrium is not clearly defined (red arrows) as in WT.

Fig. 5 Epithelial morphology after conditional deletion of *Dlx5*, *Dlx6* and *Foxl2* in the uterus (PN28). *Dlx5^Δ/Dlx6^{+/-} PGR^{Cre/+}* mice present a large space between the epithelium and the stroma (red arrow) not seen in WT. In some regions the epithelium is smaller and hypomorphic. *Foxl2^{Δ/Δ} PGR^{Cre/+}* uterine epithelium seems also abnormal.



3. In Human pathologies

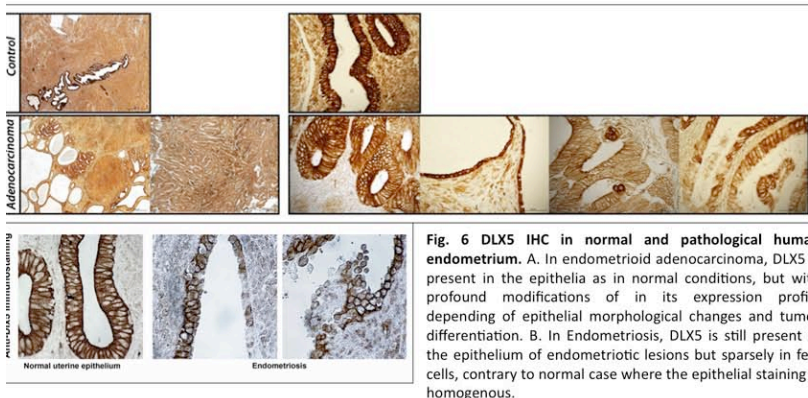


Fig. 6 DLX5 IHC in normal and pathological human endometrium. A. In endometrioid adenocarcinoma, DLX5 is present in the epithelia as in normal conditions, but with profound modifications of its expression profile depending of epithelial morphological changes and tumor differentiation. B. In Endometriosis, DLX5 is still present in the epithelium of endometriotic lesions but sparsely in few cells, contrary to normal case where the epithelial staining is homogenous.

CONCLUSION

Dlx5/6 and *Foxl2* are expressed in the uterus and present a complementary expression pattern as in ovarian granulosa cells. *Dlx5* and *Dlx6* are expressed in luminal and glandular uterine epithelia while *Foxl2* is expressed both in the stroma and in the epithelia until birth; both genes persist to adulthood.

During the estrous cycle and implantation, the profile of expression of *Dlx5* does not change. On the other hand, *Foxl2* positive cells decrease in the stroma when progesterone (P4) levels are high (diestrus and metestrus) and seem to be negatively regulated by P4. This notion is reinforced by the decrease of *Foxl2* observed during implantation and by recent data obtained on bovine uterus after P4 treatment (Eozenou *et al.* 2012).

Conditional deletion of these genes in the post-natal uterus provokes different uterine phenotypes: *Dlx5* and *Dlx6* seems to be important for the global growth of the uterus, and for epithelia-stromal interaction. *Foxl2* seems to have a major role for adenogenesis and stromal cell proliferation.

Finally, these genes are deregulated in different human pathologies of the uterus. In endometriosis DLX5 is poorly expressed while FOXL2 is overexpressed (Hu *et al.* 2008).

In endometriotic adenocarcinoma, DLX5 is strongly expressed by the epithelium but its pattern of expression appears to be patchy depending on the stage of tumor differentiation.

Article

Allelic reduction of Dlx5 and Dlx6 results in impaired ovarian function: a new mouse model of Premature Ovarian Failure

Kamal Bouhali, Aurélie Dipietromaria, Sandrine Caburet, Anastasia Fontaine, Ottavia Barbieri, **Brice Bellessort**, Marc Fellous, Reiner A. Veitia, and Giovanni Levi

Human Molecular Genetics, 2011 Jul 1;20(13):2642-50

Allelic reduction of *Dlx5* and *Dlx6* results in early follicular depletion: a new mouse model of primary ovarian insufficiency

Kamal Bouhali¹, Aurélie Dipietromaria¹, Anastasia Fontaine¹, Sandrine Caburet², Ottavia Barbieri³, Brice Bellessort¹, Marc Fellous^{4,5}, Reiner A. Veitia² and Giovanni Levi^{1,*}

¹Évolution des Régulations Endocriniennes, CNRS UMR7221, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris 75005, France, ²Institut Jacques Monod, Université Denis Diderot, CNRS UMR7592, Paris 75013, France, ³Department of Experimental Medicine, University of Genova, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova, Italy, ⁴Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS UMR 8104, Paris 75005, France and ⁵Inserm, U567, Paris 75005, France

Received February 25, 2011; Revised and Accepted April 13, 2011

Primary ovarian insufficiency (POI) is characterized by the loss of ovarian function before the age of 40 in humans. Although most cases of POI are idiopathic, many are familial, underlying a genetic origin of the disease. Mutations in genes involved in the control of steroidogenesis, such as *NR5A1* (*SF-1*, *Steroidogenic Factor 1*), *CYP17*, *CYP19A1* (*aromatase*), *StAR* (*Steroidogenic Acute Regulatory*), and the forkhead transcription factor *FOXL2* have been associated with different forms of POI. In males, the homeobox transcription factors *Dlx5* and *Dlx6* are involved in the control of steroidogenesis through the activation of GATA4-induced-*StAR* transcription. Here, we analyze the potential involvement of *Dlx5* and *Dlx6* in female reproduction. To this end, we make use of an existing mouse model in which *Dlx5* and *Dlx6* are simultaneously disrupted. We show that: (i) allelic reduction of *Dlx5* and *Dlx6* in the mouse results in a POI-like phenotype, characterized by reduced fertility and early follicular exhaustion; (ii) in granulosa cell lines, a reciprocal regulation exists between *Dlx5* and *Foxl2*; (iii) in the mouse ovary, allelic reduction of *Dlx5/6* results in the upregulation of *Foxl2*. We propose that the mutual regulation between *Dlx5/6* and *Foxl2* and their opposite effects on *StAR* expression might contribute to determine the homeostatic control of steroidogenesis within the ovary. Dysregulation of this homeostatic control would result in abnormal follicular maturation and reduced fertility. Our results bring new elements to our conceptual model of follicle maturation and maintenance and provide new potential genetic targets for cases of familial POI.

INTRODUCTION

Primary ovarian insufficiency (POI) (1), the early loss of normal ovarian function, can result from different ovarian defects including early decrease in the primordial follicle pool, increased or accelerated follicular atresia, follicle growth blockade or increased follicle exhaustion owing to accelerated maturation. The clinical characteristics of POI are a primary or secondary amenorrhea with elevated levels of circulating gonadotropins like luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) and low levels of estradiol.

Although most cases of POI are idiopathic, and few are due to metabolic, autoimmune or iatrogenic causes, compelling evidence suggest that certain forms of the disease have a genetic etiology. Many POI cases are familial (2–5) and specific genetic alterations or mutations have been associated with syndromic or non-syndromic forms of POI (1). Although the most frequent anomalies are chromosome X alterations, POI-associated mutations have been also identified in autosomal genes: *ATM* (mutated in Ataxia Telangiectasia) (6,7), *FSHR* (8), *GDF9* (9), *NOBOX* (10,11), *AIRE* (12), the Steroidogenic Acute Regulatory gene (*StAR*) (13) and the forkhead transcription factor *FOXL2*. In particular, mutations of

*To whom correspondence should be addressed at: CNRS UMR7221, Evolution des Régulations Endocriniennes, Muséum National d'Histoire Naturelle, 7 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France. Tel: +33 140793621; Fax: +33 140793618; Email: glevi@mnhn.fr

FOXL2, responsible for Blepharophimosis Ptosis Epicanthus inversus Syndrome, a rare syndrome characterized by complex eyelid malformations, have also been associated with POI (14–16).

FOXL2 is expressed in the ovary, where it regulates the expression of genes involved in the control of steroidogenesis (17,18): it interacts with Steroidogenic Factor-1 (SF-1) and inhibits the expression of both *CYP17* (17) and *StAR* (19) and activates the expression of *CYP19A1* (*aromatase*) (20), suggesting that its involvement in POI might result from a dysregulation of steroid biosynthesis. *StAR*-mediated mitochondrial cholesterol transport is the rate-limiting step in steroid biosynthesis and is therefore one of the best targets for the regulation of steroid availability. Among the many transcription factors and signaling pathways involved in the control of *StAR*, we have recently shown that the homeobox transcription factor *Dlx5* activates *StAR* expression in cooperation with *GATA-4* (21).

Dlx genes comprise a highly conserved family of homeobox genes homologous to the *Distal-less* (*Dll*) gene of *Drosophila*. During embryonic development, *Dlx* genes are expressed in craniofacial primordia, basal telencephalon and diencephalon, in the distal regions of extending appendages, in differentiating osteoblasts and in Leydig cells.

Deletion of the coding and intergenic regions of *Dlx5* and *Dlx6* with a single targeting event in the mouse results in perinatal death and in a limb malformation reminiscent of the human ectrodactyly, Split Hand Foot Malformation type I (SHFM1) and in the lower-to-upper jaw transformation (22–24).

Besides these patterning defects, these same mutants have also permitted to identify the roles for *Dlx5* and *Dlx6* in the control of cell differentiation. In particular, *Dlx5/6* play a role in the control of bone development (25) and in the differentiation of Leydig cells (21). Besides both being upstream regulators of *StAR*, *Dlx5/6* and *Foxl2* appear to be associated in a common regulatory network. *Foxl2* expression is strongly activated in the first pharyngeal arch of *Dlx5/6*-null embryos indicating that *Dlx5/6* are direct or indirect repressors of its expression (26).

Here, we make use of the same *Dlx5/6* mutants to analyze the function of these genes in female reproduction. We show that the allelic reduction of *Dlx5* and *Dlx6* in the mouse results in a POI phenotype characterized by the rapid depletion of the follicular pool and premature female infertility and that a mutual regulation between *Foxl2* and *Dlx5* also takes place in the ovary. Our findings suggest a more general implication of *Dlx* genes in the control of steroidogenesis and reproduction than previously suspected.

RESULTS

Allelic reduction of *Dlx5* and *Dlx6* results in female subfertility

We have noticed that *Dlx5/6*^{+/-} mice are subfertile. Intercross between heterozygous animals carrying this mutant haplotype backcrossed on the B6D2F1/JRj genetic background rarely resulted in pregnancy. Consequently, the few litters obtained were constituted by a small number of pups and it was almost impossible to obtain homozygous embryos. Therefore,

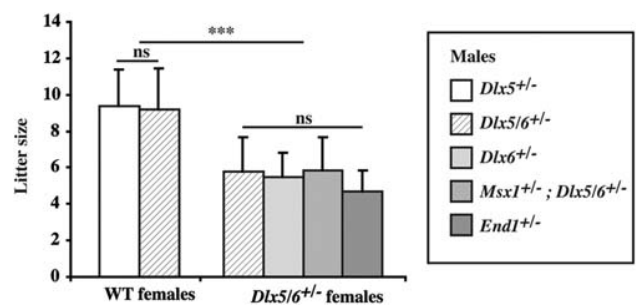


Figure 1. Average litter size of WT and *Dlx5/6*^{+/-} female mice when mated with different transgenic males. B6D2-*Dlx5/6*^{+/-}/N males produced the same number of pups (9.17 ± 2.28) as males carrying other mutations on the same genetic background [e.g. B6D2-*Dlx5*^{+/-}/N (9.36 ± 2.00)]; this value corresponds to the average litter size of B6D2 male mice in our animal facility. The litter size obtained crossing B6D2-*Dlx5/6*^{+/-} females crossed with B6D2 males was reduced by about 40% ($P < 10^{-5}$) independently from the genotype of the male. Statistical analyses by *t*-test. *** $P < 10^{-5}$.

for many years, the *Dlx5/6* mutation has been backcrossed on the B6D2F1/N genetic background. To gather information about the reproductive status of mice carrying the *Dlx5/6*^{+/-} haplotype, we analyzed the breeding record of our colony over 10 years (Fig. 1). First, we analyzed the number of pups per litter.

On the one hand, when crossed with wild-type (WT) females, B6D2-*Dlx5/6*^{+/-}/N males produced the same number of pups (9.17 ± 2.28) as males carrying other mutations on the same genetic background (e.g. B6D2-*Dlx5*^{+/-}/N (9.36 ± 2.00)); this value corresponds to the average litter size of B6D2 male mice in our animal facility. We concluded that *Dlx5/6*^{+/-} males were not subfertile.

On the other hand, we observed a pronounced reduction in the number of pups per litter of *Dlx5/6*^{+/-} females. Indeed, when *Dlx5/6*^{+/-} females were crossed with B6D2 partners, the litter size was invariably reduced by about 40% independently of other heterozygous mutant alleles carried by the males (Fig. 1). This reduction in litter size was highly significant and reproducible ($P < 10^{-5}$).

The female subfertility associated with the *Dlx5/6*^{+/-} mutation was also associated with a shorter reproductive age of these mice. Indeed, *Dlx5/6*^{+/-} females produced in average 1.8 litters ($n = 31$) and most of them carried their last litter no later than at 6 months (22/31) of age; whereas, their WT littermates produced an average of 4.5 litters and in most cases had the last litter after 1 year of age.

This reduced fertility was accompanied by significantly increased levels of LH in 6-month-old *Dlx5/6*^{+/-} females (WT 0.22 ± 0.14 ng/ml; *Dlx5/6*^{+/-} 0.59 ± 0.19 ng/ml; $P = 0.019$); variations in FSH and estradiol did not reach a level of significance in the sample we analyzed.

Allelic reduction of *Dlx5* and *Dlx6* results in premature follicular maturation

Given the strong female subfertility associated with the *Dlx5/6* mutation, we further analyzed the ovarian phenotype of these animals.

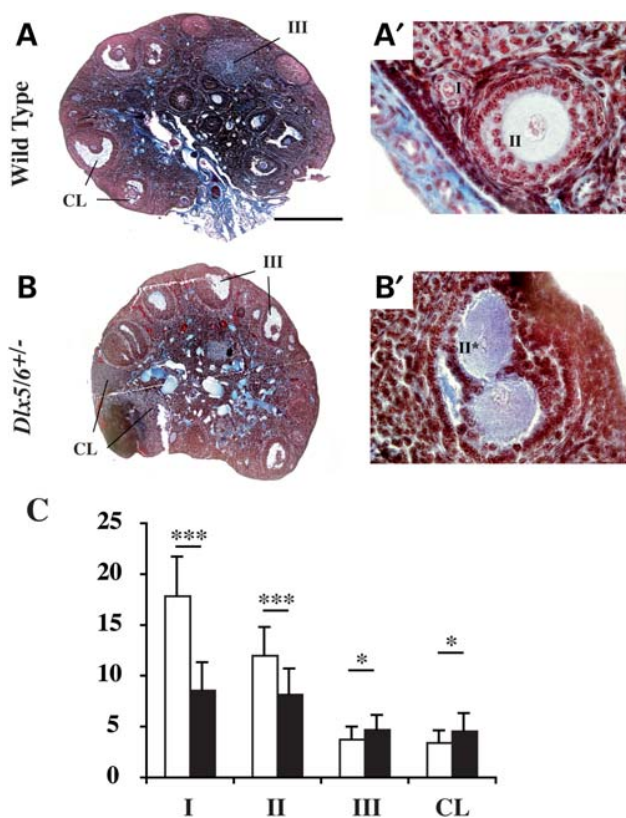


Figure 2. Early follicular exhaustion in *Dlx5/6*^{+/-} mice. (A–B') Sagittal sections of WT (A, A') and *Dlx5/6*^{+/-} (B, B') littermate ovaries. I: primordial and primary follicles; II: secondary and pre-antral follicles (II* malformed secondary follicle); III: antral and pre-ovulatory follicles; CL: corpora lutea. Scale bar: (A, B) 0.5 mm; (A', B') 50 μ m. (C) Average number of follicles in sections of WT (open bars) and *Dlx5/6*^{+/-} (black bars) ovaries. The values represent the average number per section \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses by *t*-test. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

Histological analysis of 6-month-old mice ovaries revealed an abnormal follicular maturation in *Dlx5/6*^{+/-} mice (Fig. 2B and B') compared with their WT littermates (Fig. 2A and A'). Mutant ovaries were smaller and presented a higher number of abnormal follicles containing multiple oocytes (Fig. 2B and B'). In particular, *Dlx5/6*^{+/-} ovaries had a highly significant reduction in the number of primordial/primary follicles and secondary/pre-antral follicles and a significant increase of antral/pre-ovulatory follicles and corpora lutea (Fig. 2C). These results indicate a depletion of the follicular pool in *Dlx5/6*^{+/-} mice, which is likely to result from a higher and premature follicular activation.

To better understand the mode of action of *Dlx5* and *Dlx6* on follicular maturation, we have analyzed their pattern of expression in the mouse ovary and we have compared it with that of *Foxl2*. *Dlx5* immunoreactivity (Fig. 3A, A' and A'') is not detectable in primordial and primary follicles, but is clearly present in the majority of secondary, preantral and antral follicles in granulosa and theca cells (arrows in Fig. 3A' and A''). *Foxl2* immunoreactivity (Fig. 3B, B' and B'') is strongly detected in primordial (arrowheads) and primary follicles and is much lower in secondary and antral follicles [(27); Fig. 3B, B' and B''].

In situ hybridization with *Dlx6*- (Fig. 3C) and *Dlx5*- (Fig. 3D) specific probes (24) resulted in a pattern of expression similar to that obtained with anti-DLX5 antibodies, showing high levels of expression in secondary, preantral and antral follicles (II and III in Fig. 3C) and very low levels in primary and primordial follicles (arrowheads in Fig. 3D).

Both at the protein and at the mRNA level, the pattern of *Dlx5/6* and *Foxl2* distribution (28) during follicular maturation is partially overlapping in the granulosa of mature follicles and is to a large extent complementary in earlier follicles and in theca cells suggesting a possible mutual regulation.

Reciprocal regulation between *Dlx5/6* and *Foxl2* in granulosa cells

In the first pharyngeal arch mesenchyme of the early mouse embryo, *Dlx5* and *Dlx6* are repressors of *Foxl2* (26). To explore if a similar regulation could be found also in adult ovarian granulosa cells, we simultaneously transfected KGN human granulosa-like cells (29) with: (i) a reporter construct (*pFoxL2-luc*, Fig. 4A) in which the luciferase gene is under the control of the *FoxL2* promoter and (ii) an expression vector for either *FOXL2* or *Dlx5*. In agreement with the previously published data (30–32), *FOXL2* was a strong activator of *pFoxL2-luc* (Fig. 4C; $P = 10^{-7}$). Conversely, co-transfection of *pFoxL2-luc* and the *Dlx5* expression vector resulted in a significant decrease in the *pFoxL2-luc* expression (Fig. 4D; $P = 7 \times 10^{-5}$) when compared with the endogenous activation of *pFoxL2-luc* in KGN cells. A similar regulation was found when identical experiments were repeated on the COV434 granulosa cell line (data not shown). These data suggest that *Dlx5* is a transcriptional repressor of *FOXL2* also in adult granulosa cells. Inspection of the *pFoxL2-luc* construct revealed the presence of a putative *Dlx* response element at position –860 (Fig. 4A). To explore the possibility that this response element is involved in *FOXL2* repression by *Dlx5*, we generated two truncated variants of the *pFoxL2-luc* vector (*p-704-luc* and *p-527-luc*), which did not include the putative *Dlx5*-binding element (Fig. 4A). The *Dlx5*-mediated inhibition was maintained on both constructs (Fig. 4D) suggesting an indirect action of *Dlx5*. As expected, *p-527-luc*, which lacked the two major *FOXL2*-responsive elements at –579 and –569 (32), lost the capacity to be activated by *FOXL2* ($P = 0.85$; Fig. 4C). However, its basal level of expression was still significantly reduced by *Dlx5* ($P = 9 \times 10^{-3}$; Fig. 4D). Similar results were obtained in KGN and COV434 granulosa cell lines.

To explore the possibility that *FOXL2* could exert a reciprocal regulation on the expression of *Dlx5/6*, we co-transfected KGN cells with reporter vectors in which the luciferase gene is under the regulation of two well-known *Dlx5/6* intragenic enhancers (*p-m156i-luc* and *p-m156ii-luc*; Fig. 4B) and a *FOXL2* expression vector. *FOXL2* could activate significantly the expression level of both reporters (*p-m156i-luc*: $P = 10^{-3}$; *p-m156ii-luc*: $P = 9 \times 10^{-6}$) suggesting that it can act as an activator of *Dlx5/6* (Fig. 4E).

Foxl2 regulation in *Dlx5/6*^{+/-} ovaries

To test whether *Dlx5/6* allelic reduction results in the regulation of *Foxl2* *in vivo*, we performed *in situ* expression

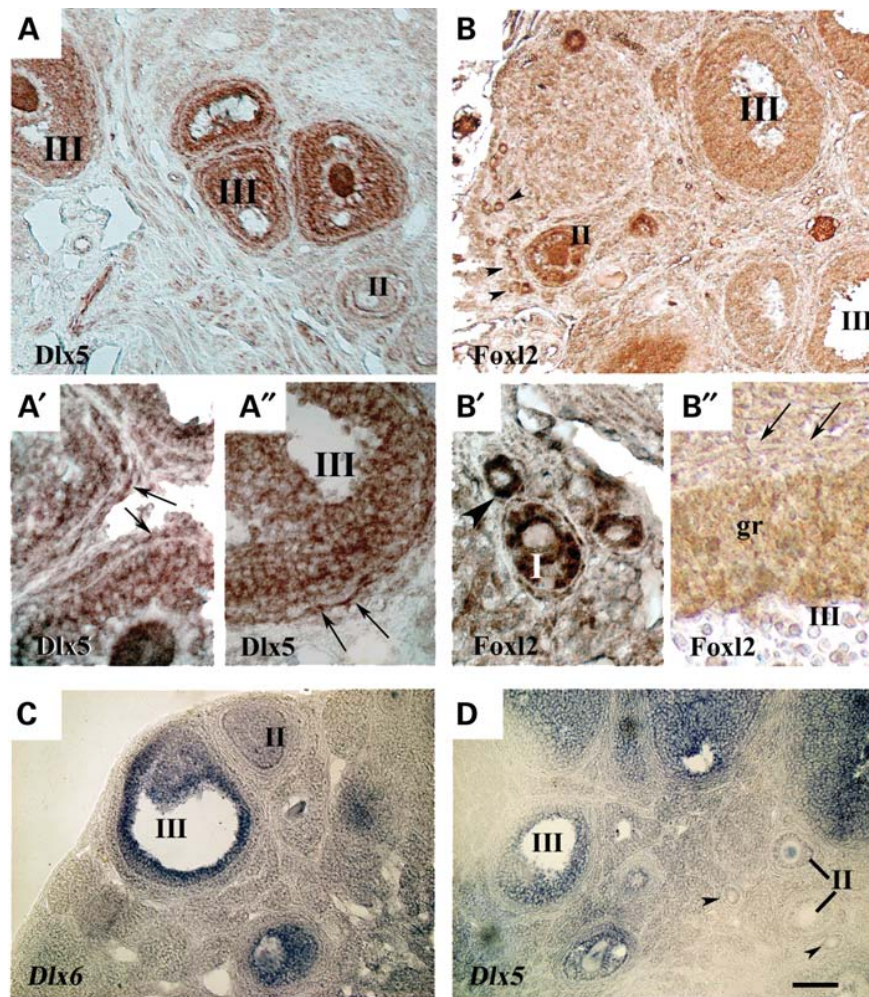


Figure 3. Localization of *Dlx5*, *Dlx6* and *Foxl2* expression in the mouse ovary. *Dlx5* immunostaining (A, A' and A'') was present in the granulosa (gr) and theca cells (arrows) of secondary (II), preantral and antral (III) follicles and was much weaker in less-differentiated follicles. Strong *Foxl2* immunostaining (B, B' and B'') was present in primordial (arrowheads) and primary follicles (I) and strongly reduced in more differentiated follicles. *In situ* hybridization using antisense RNA probes against *Dlx6* (C) and *Dlx5* (D). *Dlx6* and *Dlx5* expression was detected in secondary, preantral, and antral granulosa and theca cells, but not in primordial or primary follicles. Scale bar: (A, B) 50 μ m; (A', A'') 25 μ m; (B', B'') 5 μ m; (C, D) 100 μ m.

analyses on *Dlx5/6*^{+/-} ovaries (Fig. 5). As already seen at the protein level (Fig. 3B), in WT ovaries, *Foxl2* is expressed in granulosa cells at all stages of follicle maturation. However, its expression decreases during follicular maturation (Fig. 5B and E). In primary and secondary follicles, we could not detect any difference in the level of *Foxl2* expression between WT and *Dlx5/6*^{+/-} ovaries (Fig. 5B and C). On the same sections, however, the *Foxl2 in situ* hybridization signal was clearly more intense in the antral follicles of *Dlx5/6*^{+/-} animals (Fig. 5E and F), indicating its upregulation at late stages of follicular maturation in a mutant background.

DISCUSSION

In this study, we have shown that allelic reduction of *Dlx5* and *Dlx6* in the mouse results in reduced female fertility characterized by smaller litter size and premature reproduction arrest. Histological analysis of *Dlx5/6*^{+/-} ovaries reveals a premature

follicular depletion. As FSH and LH levels are not decreased in *Dlx5/6*^{+/-} mice, the reduced fertility could be interpreted as a form of POI.

In humans, POI is characterized by at least 6 months of amenorrhea, sex steroid deficiency and high serum concentrations of FSH before the age of 40. Our mouse model presented a similar subfertility profile, but hormonal levels and ovarian histology were analyzed before the arrest of the reproductive period. The rapid depletion of the follicular pool and the increased levels of LH are compatible with certain POI phenotypes observed in other mouse models (1,33).

One of the genes responsible for autosomal familial cases of syndromic POI is the forkhead transcription factor FOXL2. In humans, FOXL2 is one of the earliest known markers (27) of ovarian differentiation and plays a role at an early stage of ovarian development. FOXL2 is also strongly expressed in postnatal and adult follicular cells and is involved in ovarian development and/or maintenance during all female fertile

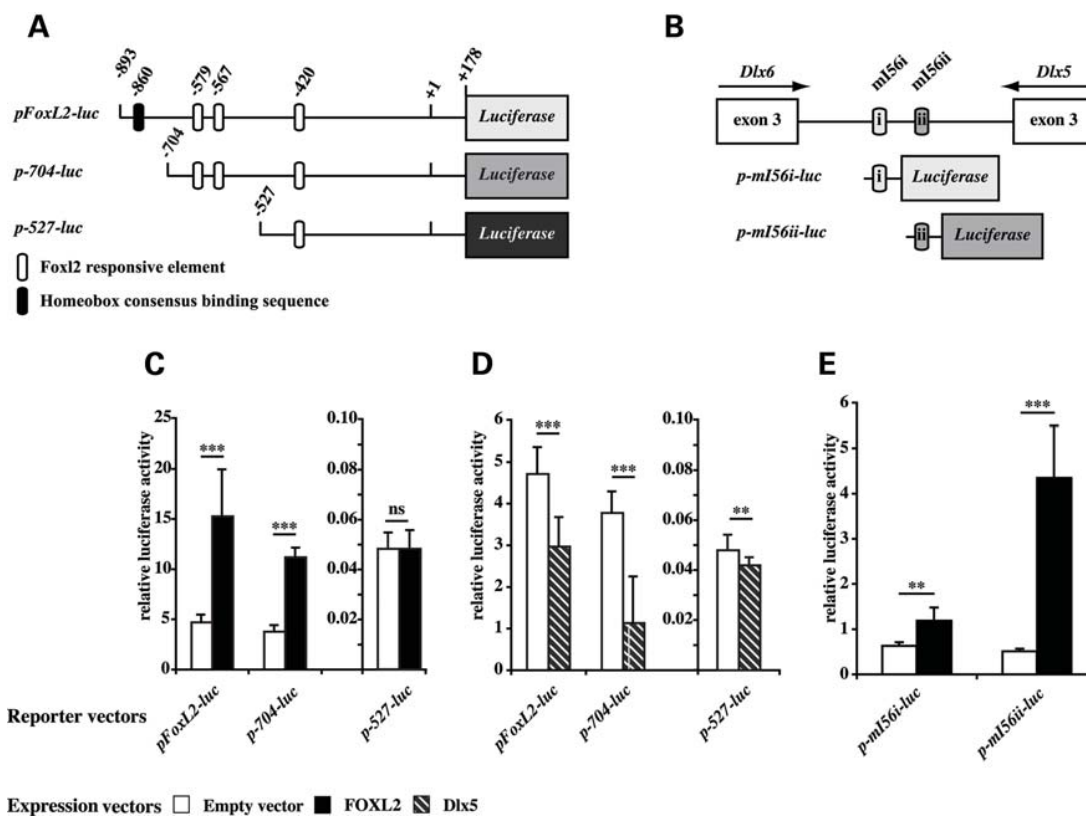


Figure 4. Mutual regulation between *Dlx5* and *FOXL2* in cultured granulosa cells. (A) Representation of the *pFoxL2-luc* luciferase reporter vector and of its truncated variants, indicating the putative FoxL2 and homeobox binding sites. (B) Representation of the *Dlx5*/*Dlx6* intragenic region containing two conserved enhancers (upper panel) and of the *p-m156i-luc* and *p-m156ii-luc* reporter vectors. (C, D, E) Relative luciferase activity assessed in KGN granulosa cells, transfected with the luciferase reporter vectors (indicated in the X-axis) and either an empty vector (open bars), FOXL2 (black bars) or Dlx5 (dashed bars) expression vectors. Relative luciferase units represent mean values obtained from six biologically independent replicates. Error bars represent standard deviation between replicates. Statistical analyses by *t*-test. ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

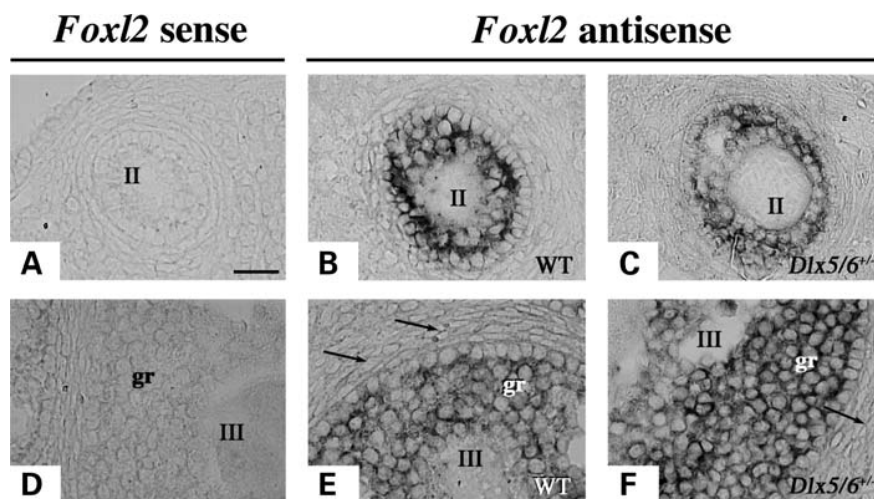


Figure 5. *Foxl2* expression in *Dlx5/6^{+/-}* ovaries. *Foxl2 in situ* hybridization on 6-month-old WT (A, B, D, E) and *Dlx5/6^{+/-}* (C, F) ovarian cryosections. *Foxl2* is expressed by granulosa cells (gr) of secondary (II) and antral (III) follicles and is not detected in theca cells (arrows). (A, D) Control *in situ* hybridization using *Foxl2* sense mRNA probe; (B, C, E, F) *Foxl2* antisense *in situ* hybridization on WT (B, E) and *Dlx5/6^{+/-}* (C, F) ovaries. A, D; B, E; C, F represent follicles at different stages of maturation present on the same section. The *Foxl2* signal is more intense in of *Dlx5/6^{+/-}* mutants than in WT antral follicles. Scale bar: 50 μ m in (A–C); 100 μ m in (D–F).

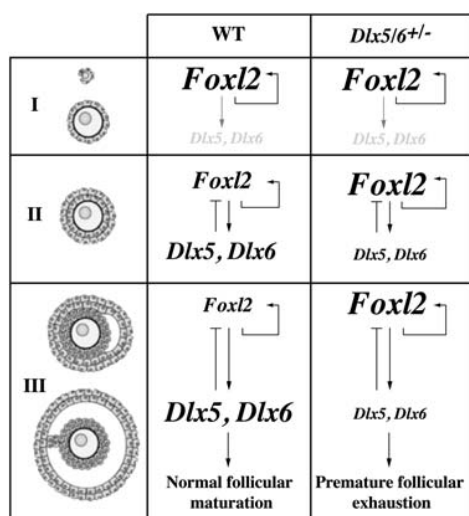


Figure 6. Summary diagram depicting the complementary expression levels of *Foxl2* and *Dlx5, Dlx6* during folliculogenesis and their mutual regulation in granulosa cells. After allelic reduction of *Dlx5/6* (right column), *Foxl2* is de-repressed resulting in premature follicular exhaustion. I: primordial–primary follicle, II: secondary follicle, III: antral-mature follicle.

life (28). Indeed, recently, by conditional inactivation of *Foxl2* in the mouse, it has been shown that *Foxl2* is required to prevent transdifferentiation of an adult ovary to a testis (34). *Foxl2*-targeted inactivation in adult ovarian follicles results in reprogramming of granulosa and theca lineages into Sertoli-like and Leydig-like cell lineages.

As *Dlx5/6* are suppressors of *Foxl2* during mouse embryonic craniofacial development (26), we have verified if a similar regulation was present also in the ovary. *In vitro*, our results suggest that a reciprocal regulatory loop might exist between *FOXL2* and *Dlx5*: *Dlx5* inhibits the expression of *Foxl2*, whereas the latter activates both its own transcription and that of *Dlx5/6*. *In vivo*, this finding was mirrored by an increase in *Foxl2* expression in *Dlx5/6^{+/-}* ovaries.

Our results suggest that a reciprocal regulatory loop might exist between *Foxl2* and *Dlx5/6* during folliculogenesis (Fig. 6). *Foxl2* is strongly expressed in primordial and primary follicles but its expression decreases during follicle maturation. High levels of *Foxl2* are present in primordial and primary follicles, whereas *Dlx5* is not detected (Fig. 3 and Fig. 6, upper panel). We have shown that *FOXL2* can activate the expression of *Dlx5/6* in granulosa cells. It is therefore possible that, during early stages of follicular maturation, *Foxl2* initiates the expression of *Dlx5/6*. In secondary follicles, *Dlx5* and *Dlx6* are co-expressed with *Foxl2* in granulosa cells and could be involved in its downregulation (Fig. 6, middle panel). Finally, in mature antral follicles, *Dlx5* and *Dlx6* are highly expressed. Allelic reduction of *Dlx5* and *Dlx6* results in an accelerated follicular maturation and in premature follicular exhaustion. We find a higher level of *Foxl2* expression in antral follicles of mutant ovaries, which could be explained by a partial reduction of the *Dlx5/6*-dependent inhibition (Fig. 6, lower panel). Indeed, the ovarian phenotype observed in our mouse model is the opposite of that observed in *Foxl2^{-/-}* mice, where follicles are blocked at primordial–

primary transition (28). Similarly, in POI patients carrying *FOXL2* mutations, follicles often fail to undergo maturation (35).

The cooperation between *Dlx5/6* and *Foxl2* might also affect the process of steroidogenesis. We have previously shown that *Dlx5/6* are expressed in fetal Leydig cells during mouse testis development, their double homozygous inactivation leads to decreased testosterone levels and to an abnormal masculinization phenotype. The mechanism through which *Dlx5* regulates steroidogenesis involves a GATA-4-dependent activation of *StAR* (21). *Foxl2* might also be involved in the regulation of *StAR* as an indirect inhibitor (19). These findings suggest that the mutual regulation between *Dlx5/6* and *Foxl2* and their opposite effects on *StAR* expression might contribute to determine the homeostatic control of steroidogenesis within the ovary. Dysregulation of this homeostatic control would result in abnormal follicular maturation and reduced fertility. As *Dlx5/6* homozygous mutants die at birth, further studies on conditional and inducible mouse mutants will permit to better elucidate the regulatory network involving *Dlx5/6* and *Foxl2*.

Our results provide new candidate genes to better understand the genetic bases of POI and, more generally, of follicle maturation and maintenance. The *Dlx5/6* locus becomes a natural target to search for POI-associated mutations; this same locus has been previously associated with SHFM (22); however, no mutation has been identified in the coding region of these genes suggesting a regulatory defect (36,37). As POI is not associated with limb or craniofacial defects ascribable to *Dlx5/6*, it is likely that an ovary-specific enhancer is involved.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Animal procedures were approved by National and Institutional ethical committees. *Dlx5* and *Dlx5/6* mutant mice were genotyped as previously described (22,24,38). DNA was extracted from mice tails using a lysis buffer (sodium hydroxide) and neutralized with a neutralization buffer (Tris–HCl and ethylene diaminetetraacetic acid). Animals were backcrossed with WT B6D2F1/JRj females purchased from Elevage Janvier (France) or with WT B6D2F1/N from Charles River Laboratory (Italy). The relative fertility of *Dlx5/6^{+/-}* heterozygous mutants was determined by analyzing the record of over 10 years of crossings of these animals (about 36 generations) performed in the animal facility of the Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, IST, Genova, Italy.

Histological analysis

Ovaries of 6-month-old mice were fixed overnight (O/N) in Bouin's fixative (Sigma, France) at 4°C. Samples were then dehydrated with ethanol and Safe Solv (Labonord, France) and embedded in paraffin. Serial 8 µm sections of the whole ovary were stained by Mallory Trichromic protocol [Groat's hematoxylin, acid fuchsin, aniline blue/orange G (39)]. We prepared a complete set of parasagittal serial sections of

each ovary analyzed. Follicles were counted from three non-adjacent sections roughly positioned in the central part of each ovary using an optical microscope (Olympus). Secondary and antral follicles were visualized using a 20X objective, primordial and primary follicles with an oil-immersion 100X objective. All the surface of each section was inspected blindly to the genotype for the presence of follicles and the total number of follicles per section was considered.

In situ hybridization

Ovaries of 6-month-old mice were dissected in phosphate-buffered saline (PBS), fixed overnight in 4% formaldehyde at 4°C, then cryoprotected by immersion in sucrose 15% then 30% in PBS before mounting on Tissue-Tek. Superfrost Ultra Plus slides (Menzel-Gläser) were used to collect 8 µm cryosections and stored at -80°C before further use.

Gene expression was analyzed by *in situ* hybridization using digoxigenin (DIG)-UTP-labeled antisense RNA probes against *Dlx5*, *Dlx6* (40) and *Foxl2*. After hybridization, probes were detected using an alkaline-phosphatase-conjugated anti-DIG antibody and BM Purple substrate (Roche).

Immunohistochemistry

Paraffin sections of 8 µm were used for immunodetection using anti-FOXL2 directed against the C-terminal region (1/350) (27) and anti-DLX5 (1/500) antibodies (no. HPA005670, Sigma).

Slides were rehydrated and endogenous peroxidases were inactivated by 2% H₂O₂ treatment for 15 min. Antigen retrieval was performed in citrate buffer (1.8 mM citric acid, 8.2 mM sodium citrate, pH 6.0) by microwave heating for 5 min twice (650 W); non-specific sites were blocked with PBS containing 10% fetal calf serum (FCS) (Sigma). Primary antibodies were diluted in PBS containing 1% FCS and incubated overnight at 4°C. Immunodetection was carried out following manufacturer's instructions (no. K4010, Dako).

Hormonal dosage

Blood was collected from 6-month-old mice in heparin tubes. Plasma was separated by centrifugation and stored at -20°C.

Circulating levels of LH, FSH (ImmunoDiagnostic System nos CL-AHR002 and CL-AHR004) and estradiol (Beckman no. DSL-4800) were measured by radioimmunoassay.

Statistical analyses were performed using non-parametric Mann-Whitney test.

Plasmids and expression vectors

Human *FOXL2* ORF was cloned into pcDNA3.1-topoTA cloning vector (Invitrogen, CA, USA) driven by a cytomegalovirus promoter (41) and sequenced. Murine *Dlx5* cDNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned in pCS2 + MT using *Bam*H1 restriction enzyme.

pFoxL2-luc was obtained, containing the -893/+178 caprine *FoxL2* promoter driving the luciferase expression. The *FoxL2* promoter was obtained by PCR and inserted in pGL3-basic vector (Promega, Madison, WI, USA) after

*Kpn*1/*Xho*1 enzyme digestion (20). The promoter fragment -704/+178 was obtained by digestion of *pFoxL2-luc* with, respectively, *Kpn*1/*Mlu*1 restriction. The -527/+178 promoter fragment was obtained by PCR using *pFOXL2-luc* vector as the matrix.

p-mI56i-luc and *p-mI56ii-luc* plasmids are pGL4-24 (Promega) vectors in which the *Dlx5/6* intragenic conserved enhancers [i and ii, (42)] have been cloned upstream of a minimal promoter driving luciferase expression.

Cell culture and transfection

Human granulosa cells lines [KGN (29) or COV434 (43)] were grown in DMEM-F12 medium, supplemented with 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, CA, USA). Cells were seeded in 24-well plates 12 h before transfection at a density of 4×10^4 cells/cm². For transfection, the calcium-phosphate method was used (44).

Luciferase assays

Reporter assays were performed using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). A Renilla luciferase vector (pRL-RSV, Promega) was co-transfected to monitor transfection efficiency. For each replicate, the firefly activity observed was divided by the activity recorded from Renilla luciferase vector. Luminescence was measured using Berthold LB941 multimode reader TriStar and analyzed with Mikrowin version 4.3x software.

KGN or COV434 cells were cotransfected with 570 ng of luciferase reporter vector (*pFoxL2-luc* or its truncated variants, *p-mI56i-luc*, *p-mI56ii-luc*), 400 ng of inducer vector (empty vector, *FOXL2* or *Dlx5* expression vectors) and 30 ng of *Renilla pRL-RSV* control vector.

For each experiment, luciferase activity was measured on six biologically independent replicates of either KGN or COV434 cells. Relative luciferase units represent mean values obtained from independent replicates and are the ratio of firefly luciferase activity over Renilla luciferase activity in the samples. Statistical significance was estimated by a Student's *t*-test.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Mathias Treier (EMBL, Heidelberg) and Dr Solange Magre (CNRS EAC 4413, Paris) for their kind gift of *Foxl2* and *StAR in situ* probes, respectively, and Dr Marc Ekker (Ottawa, Canada) and Professor Gen Yamada (Kumamoto, Japan) for reporter constructs.

Conflict of Interest statement: None declared.

FUNDING

K.B. is the recipient of doctoral fellowships from the French Ministry of Research. A.D. is supported by the Institut Emilie du Chatelet. M.F. is supported by the University Paris Diderot-Paris 7. R.A.V. and S.C. are supported by the ARC (Association pour la Recherche contre le Cancer). This

research was partially supported by the EU Consortia IDEAL (HEALTH-F2-2011-259679) and CRESCENDO (LSHM-CT-2005-018652), by the EURORETT project and the ANR projects 'GENDACTYL' and 'DROS' and by Direction de la Recherche Clinique, Assistance publique-Hôpitaux de Paris (PHRC AOR 016).

REFERENCES

- De Vos, M., Devroey, P. and Fauser, B.C. (2010) Primary ovarian insufficiency. *Lancet*, **376**, 911–921.
- Lacombe, A., Lee, H., Zahed, L., Choucair, M., Muller, J.M., Nelson, S.F., Salameh, W. and Vilain, E. (2006) Disruption of POF1B binding to non-muscle actin filaments is associated with premature ovarian failure. *Am. J. Hum. Genet.*, **79**, 113–119.
- Oldenburg, R.A., van Dooren, M.F., de Graaf, B., Simons, E., Govaerts, L., Swagemakers, S., Verkerk, J.M., Oostra, B.A. and Bertoli-Avella, A.M. (2008) A genome-wide linkage scan in a Dutch family identifies a premature ovarian failure susceptibility locus. *Hum. Reprod.*, **23**, 2835–2841.
- van Kasteren, Y.M., Hundscheid, R.D., Smits, A.P., Cremers, F.P., van Zonneveld, P. and Braat, D.D. (1999) Familial idiopathic premature ovarian failure: an overrated and underestimated genetic disease? *Hum. Reprod.*, **14**, 2455–2459.
- Vegetti, W., Marozzi, A., Manfredini, E., Testa, G., Alagna, F., Nicolosi, A., Calliari, I., Taborelli, M., Tibiletti, M.G., Dalpra, L. et al. (2000) Premature ovarian failure. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **161**, 53–57.
- Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J.N., Ried, T., Tagle, D. et al. (1996) Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell*, **86**, 159–171.
- Barlow, D.H. (1996) Premature ovarian failure. *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.*, **10**, 361–384.
- Aittomaki, K., Lucena, J.L., Pakarinen, P., Sistonen, P., Tapanainen, J., Gromoll, J., Kaskikari, R., Sankila, E.M., Lehvaslaiho, H., Engel, A.R. et al. (1995) Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell*, **82**, 959–968.
- Laisue, P., Christin-Maitre, S., Touraine, P., Kuttenn, F., Ritvos, O., Aittomaki, K., Bourcigaux, N., Jacquesson, L., Bouchard, P., Frydman, R. et al. (2006) Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur. J. Endocrinol.*, **154**, 739–744.
- Qin, Y., Choi, Y., Zhao, H., Simpson, J.L., Chen, Z.J. and Rajkovic, A. (2007) NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *Am. J. Hum. Genet.*, **81**, 576–581.
- Qin, Y., Shi, Y., Zhao, Y., Carson, S.A., Simpson, J.L. and Chen, Z.J. (2009) Mutation analysis of NOBOX homeodomain in Chinese women with premature ovarian failure. *Fertil. Steril.*, **91**, 1507–1509.
- Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H.S., Kudoh, J., Minooshima, S., Heino, M., Krohn, K.J., Lalitoti, M.D., Mullis, P.E., Antonarakis, S.E. et al. (1997) Positional cloning of the APECED gene. *Nat. Genet.*, **17**, 393–398.
- Kaku, U., Kameyama, K., Izawa, M., Yamada, M., Miyamoto, J., Suzuki, T., Sasano, H. and Hasegawa, Y. (2008) Ovarian histological findings in an adult patient with the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) deficiency reveal the impairment of steroidogenesis by lipid deposition. *Endocr. J.*, **55**, 1043–1049.
- 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. *Nat. Genet.*, **27**, 159–166.
- Beysen, D., Vandesompele, J., Messiaen, L., De Paepe, A. and De Baere, E. (2004) The human FOXL2 mutation database. *Hum. Mutat.*, **24**, 189–193.
- Beysen, D., De Paepe, A. and De Baere, E. (2009) FOXL2 mutations and genomic rearrangements in BPES. *Hum. Mutat.*, **30**, 158–169.
- 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. *Mol. Endocrinol.*, **24**, 1024–1036.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 3330–3335.
- Pisarska, M.D., Bae, J., Klein, C. and Hsueh, A.J. (2004) Forkhead 12 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. *Endocrinology*, **145**, 3424–3433.
- Pannetier, M., Fabre, S., Batista, F., Kocer, A., Renault, L., Jolivet, G., Mandon-Pepin, 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. *J. Mol. Endocrinol.*, **36**, 399–413.
- Nishida, H., Miyagawa, S., Vieux-Rochas, M., Morini, M., Ogino, Y., Suzuki, K., Nakagata, N., Choi, H.S., Levi, G. and Yamada, G. (2008) Positive regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression through the interaction between Dlx and GATA-4 for testicular steroidogenesis. *Endocrinology*, **149**, 2090–2097.
- Merlo, G.R., Paleari, L., Mantero, S., Genova, F., Beverdam, A., Palmisano, G.L., Barbieri, O. and Levi, G. (2002) Mouse model of split hand/foot malformation type I. *Genesis*, **33**, 97–101.
- Robledo, R.F., Rajan, L., Li, X. and Lufkin, T. (2002) The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes Dev.*, **16**, 1089–1101.
- Beverdam, A., Merlo, G.R., Paleari, L., Mantero, S., Genova, F., Barbieri, O., Janvier, P. and Levi, G. (2002) Jaw transformation with gain of symmetry after Dlx5/Dlx6 inactivation: mirror of the past? *Genesis*, **34**, 221–227.
- Samee, N., Geoffroy, V., Marty, C., Schiltz, C., Vieux-Rochas, M., Levi, G. and de Vernejoul, M.C. (2008) Dlx5, a positive regulator of osteoblastogenesis, is essential for osteoblast-osteoclast coupling. *Am. J. Pathol.*, **173**, 773–780.
- Jeong, J., Li, X., McEvelly, R.J., Rosenfeld, M.G., Lufkin, T. and Rubenstein, J.L. (2008) Dlx genes pattern mammalian jaw primordium by regulating both lower jaw-specific and upper jaw-specific genetic programs. *Development*, **135**, 2905–2916.
- Cocquet, J., Pailhoux, E., Jaubert, F., Servel, N., Xia, X., Pannetier, M., De Baere, E., Messiaen, L., Cotinot, C., Fellous, M. et al. (2002) Evolution and expression of FOXL2. *J. Med. Genet.*, **39**, 916–921.
- Schmidt, D., Ovitt, C.E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A.C. and Treier, M. (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*, **131**, 933–942.
- Nishi, Y., Yanase, T., Mu, Y., Oba, K., Ichino, I., Saito, M., Nomura, M., Mukasa, C., Okabe, T., Goto, K. et al. (2001) Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor. *Endocrinology*, **142**, 437–445.
- Moumne, L., Dipietromaria, A., Batista, F., Kocer, A., Fellous, M., Pailhoux, E. and Veitia, R.A. (2008) Differential aggregation and functional impairment induced by polyalanine expansions in FOXL2, a transcription factor involved in cranio-facial and ovarian development. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 1010–1019.
- Benayoun, B.A., Batista, F., Auer, J., Dipietromaria, A., L'Hote, D., De Baere, E. and Veitia, R.A. (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. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 632–644.
- Benayoun, B.A., Caburet, S., Dipietromaria, A., Bailly-Bechet, M., Batista, F., Fellous, M., Vaiman, D. and Veitia, R.A. (2008) The identification and characterization of a FOXL2 response element provides insights into the pathogenesis of mutant alleles. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 3118–3127.
- Flaws, J.A., Abbud, R., Mann, R.J., Nilson, J.H. and Hirshfield, A.N. (1997) Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. *Biol. Reprod.*, **57**, 1233–1237.
- Uhlenhaut, N.H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A.C., Klugmann, C., Klasen, C., Holter, N.I. et al. (2009) Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, **139**, 1130–1142.
- Meduri, G., Bachelot, A., Duflos, C., Bstandig, B., Poirot, C., Genestie, C., Veitia, R., De Baere, E. and Touraine, P. (2010) FOXL2 mutations lead to different ovarian phenotypes in BPES patients: case report. *Hum. Reprod.*, **25**, 235–243.

36. Scherer, S.W., Poorkaj, P., Allen, T., Kim, J., Geshuri, D., Nunes, M., Soder, S., Stephens, K., Pagon, R.A., Patton, M.A. *et al.* (1994) Fine mapping of the autosomal dominant split hand/split foot locus on chromosome 7, band q21.3-q22.1. *Am. J. Hum. Genet.*, **55**, 12–20.
37. Scherer, S.W., Poorkaj, P., Massa, H., Soder, S., Allen, T., Nunes, M., Geshuri, D., Wong, E., Belloni, E., Little, S. *et al.* (1994) Physical mapping of the split hand/split foot locus on chromosome 7 and implication in syndromic ectrodactyly. *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 1345–1354.
38. Acampora, D., Merlo, G.R., Paleari, L., Zerega, B., Postiglione, M.P., Mantero, S., Bober, E., Barbieri, O., Simeone, A. and Levi, G. (1999) Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene Dlx5. *Development*, **126**, 3795–3809.
39. Sato, T., Kurihara, Y., Asai, R., Kawamura, Y., Tonami, K., Uchijima, Y., Heude, E., Ekker, M., Levi, G. and Kurihara, H. (2008) An endothelin-1 switch specifies maxillomandibular identity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 18806–18811.
40. Vieux-Rochas, M., Coen, L., Sato, T., Kurihara, Y., Gitton, Y., Barbieri, O., Le Blay, K., Merlo, G., Ekker, M., Kurihara, H. *et al.* (2007) Molecular dynamics of retinoic acid-induced craniofacial malformations: implications for the origin of gnathostome jaws. *PLoS One*, **2**, e510.
41. Caburet, S., Demarez, A., Moumne, L., Fellous, M., De Baere, E. and Veitia, R.A. (2004) A recurrent polyalanine expansion in the transcription factor FOXL2 induces extensive nuclear and cytoplasmic protein aggregation. *J. Med. Genet.*, **41**, 932–936.
42. Zerucha, T. and Ekker, M. (2000) Distal-less-related homeobox genes of vertebrates: evolution, function, and regulation. *Biochem. Cell. Biol.*, **78**, 593–601.
43. Zhang, H., Vollmer, M., De Geyter, M., Litzistorf, Y., Ladewig, A., Durrenberger, M., Guggenheim, R., Miny, P., Holzgreve, W. and De Geyter, C. (2000) Characterization of an immortalized human granulosa cell line (COV434). *Mol. Hum. Reprod.*, **6**, 146–153.
44. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.

Liste des publications

2011

- **Human Molecular Genetics 2011 Jul 1;20(13):2642-50**
« Allelic reduction of Dlx5 and Dlx6 results in impaired ovarian function: a new mouse model of Premature Ovarian Failure »
Kamal Bouhali, Aurélie Dipietromaria, Sandrine Caburet, Anastasia Fontaine, Ottavia Barbieri, **Brice Bellessort**, Marc Fellous, Reiner A. Veitia, and Giovanni Levi.

2014

- **Human Molecular Genetics 2014 Mar 15;24(6):1670-81**
« Etiology of craniofacial malformations in mouse models of blepharophimosis, ptosis and epicanthus inversus syndrome »
Églantine Heude, **Brice Bellessort**, Anastasia Fontaine, Manatsu Hamazaki, Anna-Corina Treier, Mathias Treier, Giovanni Levi and Nicolas Narboux-Nême

2015

- **Human Molecular Genetics 2015 Feb**
« Role of Foxl2 in uterine maturation and function »
Brice Bellessort, Anne Bachelot, Églantine Heude, Gladys Alfama, Anastasia Fontaine, Marine Le Cardinal, Mathias Treier and Giovanni Levi

Le gène *Foxl2* code pour un facteur de transcription membre de la famille forkhead/HNF3. Chez l'Homme, des mutations dans le gène *FOXL2* sont associées au syndrome de blépharophimosis ptosis épicanthus inversus (BPES), qui est caractérisé par des malformations des paupières et peut être associé à une insuffisance ovarienne prématurée dans certains cas chez les femmes atteintes.

Chez la souris, la mutation de ce gène provoque un défaut de formation des paupières et un défaut de maturation des follicules ovariens, reproduisant des aspect du BPES. Dans les ovaires, il existe une régulation réciproque entre *Foxl2* et *Dlx5* et *Dlx6*, dans les cellules de la granulosa où ils permettent la maturation des follicules ovariens.

Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressé à l'implication de *Foxl2*, *Dlx5* et *Dlx6* dans le développement et la fonction de l'utérus. De plus, j'ai contribué à la caractérisation du défaut de formation des paupières provoqué par l'inactivation de *Foxl2*.

Dans l'utérus, l'expression de *Foxl2* est présente dès la naissance dans le mésenchyme qui, pendant la maturation post-natale, donne origine au stroma et au myomètre. *Foxl2* est exprimé dans le stroma et dans la partie profonde du myomètre en formation. Pour étudier le rôle de *Foxl2* dans la maturation post-natale et la fonction de l'utérus, nous l'avons invalidé de manière conditionnelle grâce à l'action de la cre recombinasse contrôlée par le promoteur du récepteur de la progestérone (*Pgr^{cre/+}*). Les souris femelles *Pgr^{cre/+}; Foxl2^{flox/flox}* sont infertiles. De plus, l'utérus de ces souris présente une diminution du stroma, une hypertrophie et une désorganisation du myomètre interne. On note aussi chez ces mutants une absence de formation de la couche de cellule musculaire lisse entourant les vaisseaux sanguins dans le stroma. L'étude par qPCR montre que l'inactivation de *Foxl2* dérégule l'expression de certains gènes *Wnt*, impliqués dans la maturation utérine. En conclusion, nos données suggèrent que *Foxl2* a un rôle crucial dans la maturation postnatale du mésenchyme de l'utérus et dans la différenciation et l'organisation du myomètre.

En parallèle de mon étude sur *Foxl2*, j'ai étudié l'expression de *Dlx5* dans l'utérus, avec l'hypothèse qu'une régulation réciproque entre ces gènes pouvait aussi avoir un rôle dans cet organe. Les gènes *Dlx5* et *Dlx6* codent pour des facteurs de transcription à homéodomaine liés au gène *Distal-less (Dll)* chez la drosophile.

Dlx5 est présent dans l'épithélium des canaux de Müller à partir de E15.5 puis dans l'épithélium utérin durant toute la maturation post-natale et chez l'adulte. De la même manière que pour étudier *Foxl2* dans la maturation post-natale de l'utérus, nous avons invalidé de manière conditionnelle *Dlx5* et *Dlx6* par l'action de la *Pgr^{cre/+}*. L'étude montre que les souris *Pgr^{cre/+}; Dlx5/6^{flox/flox}* ont un nombre très réduit de glandes utérines et que la lumière utérine présente de nombreuses invaginations anormalement larges comparées aux souris contrôles. L'épithélium de ces mutants est réduit. En qPCR, nous avons montré une augmentation de l'expression *Wnt7a* et une diminution de l'expression de *Foxa2* qui jouent tout deux un rôle dans la formation des glandes. De plus, nous montrons que l'expression de *DLX5* est perturbée dans une pathologie humaine, l'endométriose, supposant que sa dérégulation pourrait jouer un rôle dans cette pathologie. *Dlx5* et *Dlx6* joueraient donc un rôle primordial dans la génération des glandes utérines, nécessaires chez l'adulte à l'implantation de l'embryon.