

Université de Montréal

**Élucidation des rôles de YAP1 et TAZ dans l'ovaire chez la souris**

*Par*

Philippe Godin

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiæ doctor* (Ph. D.)  
en sciences vétérinaires, option reproduction

Décembre 2021

© Philippe Godin, 2021

Université de Montréal

Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire

---

*Cette thèse intitulée*

**Élucidation des rôles de YAP1 et TAZ dans l'ovaire chez la souris**

*Présentée par*

**Philippe Godin**

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

**Francis Beaudry, Ph. D.**

Président-rapporteur

**Derek Boerboom, DMV, Ph. D.**

Directeur de recherche

**Julie Brind'Amour, Ph. D.**

Membre du jury

**Kristy Brown, Ph. D.**

Examinatrice externe

## Résumé

L'ovaire est un organe indispensable à la fonction reproductive, car il permet la production, la maturation et la libération de la cellule germinale femelle, l'ovocyte. Malgré son rôle central dans la régulation de la reproduction chez la femme, plusieurs de ses processus physiologiques et de ses conditions pathologiques sont encore imparfaitement décrits. La caractérisation du rôle de nouveaux régulateurs pourrait permettre l'élucidation de plusieurs questionnements actuels en physiologie ovarienne. Initialement étudiée dans l'organogenèse et l'oncogenèse pour son implication dans la prolifération, la migration, la différenciation et l'apoptose cellulaire, la voie de signalisation Hippo pourrait s'avérer être un facteur déterminant dans la physiologie ovarienne. En effet, elle a été récemment rapportée comme participant à la régulation de l'activation folliculaire, de la prolifération des cellules de la granulosa et de l'ovulation. La voie Hippo consiste en une cascade de kinases menant ultimement à la phosphorylation des deux co-régulateurs transcriptionnels YAP1 (*yes-associated protein 1*) et TAZ (*transcriptional coactivator with a PDZ-binding motif*). L'objectif général de ce projet de thèse était de caractériser les rôles de *Yap1/Taz* dans la physiologie ovarienne en utilisant des modèles murins transgéniques d'inactivation conditionnelle de ces gènes dans les cellules de la granulosa. La première portion du projet a conduit à la caractérisation d'un phénotype inattendu de défaut des oviductes. Les souris femelles adultes étaient sous-fertiles et leur fonction ovarienne était intacte. En fait, la sous-fertilité était causée par le piégeage des embryons dans des dilatations de la paroi de l'oviducte, empêchant ainsi leur transport adéquat vers l'utérus. Nous sommes parvenus à démontrer que la perte d'expression de YAP1/TAZ dans les couches musculaires de l'oviducte conduisait à un amincissement progressif de sa paroi et était ultimement responsable de l'échec du transport embryonnaire. Dans la seconde portion du projet, nous avons utilisé la culture primaire de cellules de la granulosa afin de décrire l'implication de la voie Hippo dans l'ovulation. Nous avons identifié la protéine kinase A comme modulateur clé de l'activation de la voie Hippo par l'hormone lutéinisante (LH). En utilisant un système adénoviral de délétion de *Yap1/Taz*, nous avons mis en évidence l'importance de leur expression pour l'induction de

plusieurs gènes cibles de la LH. Ensuite, au moyen d'une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine, nous avons démontré l'implication de YAP1 dans la régulation de la transcription de l'amphiréguline, un effecteur central de la cascade de signalisation de la LH. Dans son ensemble, ce projet a permis de mettre la lumière sur de nouveaux rôles de la voie de signalisation Hippo dans la régulation des cellules musculaires lisses de l'oviducte et des cellules de la granulosa durant l'ovulation chez la souris. Elles ouvrent la voie à une investigation plus précise de l'implication de la voie Hippo dans ces deux organes clés du système reproducteur femelle.

**Mots-clés** : reproduction, voie de signalisation Hippo, YAP1, TAZ, souris transgéniques, oviducte, cellules musculaires lisses, ovaire, ovulation, cellules de la granulosa



## Abstract

The ovary is a central organ of the female reproductive tract involved in oocyte production, maturation and release. Still, many physiological and pathological ovarian processes remain to be described more comprehensively. The precise characterization of the roles of new ovarian regulators would contribute to a better understanding of its physiology. The Hippo signaling pathway was initially studied for its roles in cellular proliferation, apoptosis, migration and differentiation during organ and tumor development. Recently, it has been shown to be involved during normal physiological processes of multiple organs, including the ovary. Hippo was shown to be involved in the activation of primordial follicles, in the proliferation of granulosa cells and during ovulation. Hippo consists of a central kinase cascade leading to the phosphorylation of YAP1 (*yes-associated protein 1*) and TAZ (*transcriptional coactivator with a PDZ-binding motif*), the two transcriptional coactivators of the pathway. The objective of this thesis was to characterize the precise roles of *Yap1/Taz* in ovarian physiology using transgenic mouse models of their genetic deletion in granulosa cells. The first part of this thesis project led to the characterization of an unexpected oviductal phenotype. Adult females were subfertile and their ovarian function was unaffected. The subfertility was rather caused by the entrapment of embryos in oviductal dilations, preventing their normal transport to the uterus. We demonstrated that loss of YAP1/TAZ expression in oviductal smooth muscle cells led to a gradual thinning of the oviductal wall and was responsible for the embryo transport impediment. In the second part of this project, we cultured primary mouse granulosa cells to characterize the roles of the Hippo signaling pathway during ovulation. We showed that protein kinase A is a key effector of Hippo activation following the luteinizing hormone (LH) surge. We then demonstrated that *Yap1/Taz* expression is required for the induction of several LH target genes. Using a chromatin immunoprecipitation experiment, we were able to show that YAP1 drives the expression of amphiregulin, a key paracrine transmitter of the LH signal, during the early events of ovulation. Together, these results identified new roles of the Hippo signaling pathway in the regulation of oviductal smooth muscle cells and of granulosa cells during ovulation. This thesis project opens

the door to new avenues of investigation of Hippo involvement in the regulation of the female reproductive system.

**Keywords:** reproduction, Hippo signaling pathway, YAP1, TAZ, transgenic mice, oviduct, smooth muscle cells, ovary, ovulation, granulosa cells

# Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>3</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>5</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>12</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>13</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>15</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>22</b>
<b>Avant-propos.....</b>	<b>23</b>
<b>Chapitre 1 – Revue de la littérature.....</b>	<b>25</b>
1. Système reproducteur femelle .....	26
1.1 Anatomie et histologie du système reproducteur murin femelle .....	26
1.1.1 Ovaires.....	26
1.1.2 Oviductes.....	30
1.1.3 Utérus.....	30
1.2 Développement du système reproducteur femelle.....	31
1.2.1 Ovogenèse et développement des gonades femelles .....	31
1.2.2 Développement du tractus reproducteur femelle.....	34
1.2.2.1 Embryonnaire .....	34
1.2.2.2 Postnatal.....	36
1.3 Physiologie ovarienne .....	37
1.3.1 Cycle estral .....	37
1.3.2 Folliculogénèse.....	39

1.3.2.1 Recrutement folliculaire.....	39
1.3.2.2 Croissance du stade primaire au stade secondaire .....	41
1.3.2.3 Croissance folliculaire antrale .....	43
1.3.3 Ovulation .....	46
1.3.3.1 Signalisation LH .....	48
1.3.3.2 Reprise de la méiose .....	50
1.3.3.3 Expansion du cumulus.....	50
1.3.3.4 Rupture du follicule .....	51
1.3.3.5 Lutéinisation .....	52
1.3.4 Physiologie du corps jaune.....	54
2. Voie de signalisation Hippo .....	54
2.1 Cascade de signalisation.....	55
2.1.1 Kinases MST.....	55
2.1.2 Kinases LATS .....	55
2.1.3 Coactivateurs transcriptionnels YAP1 et TAZ.....	56
2.1.3.1 Structure.....	57
2.1.3.2 Inhibition de leur activité et localisation intracellulaire .....	58
2.1.3.3 Liaison à des facteurs de transcription .....	59
2.1.4 Gènes cibles classiques .....	59
2.2 Rôle biologique.....	60
2.2.1 Dans l'organogenèse .....	61
2.2.2 Dans l'oncogenèse .....	61
2.2.3 Dans l'homéostasie tissulaire.....	62
2.3 Régulation .....	62

2.3.1 Par l'environnement physique.....	62
2.3.2 Par les GPCRs.....	63
2.3.3 Par l'interaction avec d'autres voies de signalisation.....	64
2.4 Stratégies thérapeutiques d'inhibition.....	65
2.4.1 Inhibition de la voie Hippo en amont.....	65
2.4.2 Inhibition de l'interaction YAP1-TEAD.....	65
3. Hippo dans le système reproducteur femelle.....	66
3.1 Hippo dans l'ovaire.....	66
3.1.1 Localisation des effecteurs.....	67
3.1.2 Recrutement de la réserve folliculaire.....	68
3.1.3 Folliculogénèse et réponse à la FSH.....	69
3.1.4 Ovulation et réponse à la LH.....	69
3.1.5 Cancer ovarien.....	71
3.2 Hippo dans l'oviducte et dans l'utérus.....	71
<b>Chapitre 2 – Hypothèse et objectifs.....</b>	<b>73</b>
<b>Chapitre 3 – YAP1/TAZ dans le développement de l'oviducte (Premier article).....</b>	<b>75</b>
3.1 Résumé.....	77
3.2 Introduction.....	77
3.3 Matériel et méthodes.....	80
3.4 Résultats.....	83
3.5 Discussion.....	88
3.6 Remerciements.....	92
3.7 Financement.....	92
3.8 Figures.....	93

3.9 Figures supplémentaires .....	100
3.10 Tableau .....	102
3.11 Tableaux supplémentaires .....	103
<b>Chapitre 4 – La voie Hippo dans l’ovulation (Second article) .....</b>	<b>104</b>
4.1 Résumé .....	106
4.2 Introduction .....	106
4.3 Matériel et méthodes .....	108
4.4 Résultats .....	113
4.5 Discussion .....	117
4.6 Remerciements .....	121
4.7 Financement .....	122
4.8 Figures .....	122
4.9 Figures supplémentaires .....	130
4.10 Tableaux .....	133
4.11 Tableaux supplémentaires .....	135
<b>Chapitre 5 – Discussion .....</b>	<b>138</b>
5.1 Discussion générale .....	139
5.1.1 Recherche fondamentale et santé humaine .....	139
5.1.2 Recherche dans l’ovaire .....	139
5.1.3 Système de recombinaison Cre-LoxP .....	140
5.2 Premier article .....	143
5.2.1 Limitations et défis .....	143
5.2.2 Contribution à la recherche et perspectives .....	144
5.3 Second article .....	146

5.3.1 Limitations et défis.....	146
5.3.2 Contribution à la recherche et perspectives.....	147
<b>Chapitre 6 – Conclusion.....</b>	<b>149</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>151</b>

## Liste des tableaux

### Chapitre 3 – YAP1/TAZ dans le développement de l’oviducte (Premier article)

**Tableau 1.** – Fertility of *Yap/Taz<sup>f/f</sup>* and *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* female mice.....102

**Tableau S1.** – List of qPCR primer pairs used.....103

### Chapitre 4 – La voie Hippo dans l’ovulation (Second article)

**Tableau 1.** – List of genes downregulated following loss of *Yap1/Taz* whose expression is LH and/or *Erk1/2* dependent. ....133

**Tableau S1.** – Primer sequences for quantitative PCR .....135

**Tableau S2.** – Enriched Gene-Ontology Biological Processes of genes that were both downregulated in *Yap1/Taz* deficient GCs and upregulated in WT GCs in response to LH .....136

**Tableau S3.** – Enriched Gene-Ontology Biological Processes of genes that were downregulated in both *Yap1/Taz* deficient and *Erk1/2* deficient GCs isolated 2.5 hours after hCG.....137

### Chapitre 5 – Discussion

**Tableau 1.** – Thématiques de recherche dans l’ovaire.....140



## Liste des figures

### Chapitre 1 – Revue de la littérature

<b>Figure 1.</b> – Anatomie macroscopique du système reproducteur femelle murin.....	27
<b>Figure 2.</b> – Ovaire murin adulte en coupe histologique.....	28
<b>Figure 3.</b> – Follicules ovariens humains à différents stades de la folliculogénèse.....	29
<b>Figure 4.</b> – Migration des cellules germinales primordiales durant l’embryogénèse.....	32
<b>Figure 5.</b> – Principaux effecteurs dans la différenciation sexuelle d’un embryon XX.....	34
<b>Figure 6.</b> – Développement embryonnaire du tractus reproducteur femelle.....	35
<b>Figure 7.</b> – Fluctuations hormonales durant le cycle estral murin.....	38
<b>Figure 8.</b> – Principaux effecteurs impliqués dans le recrutement des follicules primordiaux.....	41
<b>Figure 9.</b> – Coordination thèque-granulosa durant la stéroïdogénèse folliculaire.....	44
<b>Figure 10.</b> – Régulation de l’axe gonadotrope.....	47
<b>Figure 11.</b> – Cascade de signalisation de la LH dans les cellules de la granulosa.....	49
<b>Figure 12.</b> – Activation de la voie de signalisation Hippo.....	56
<b>Figure 13.</b> – Structure primaire des protéines YAP1 et TAZ.....	57

### Chapitre 3 – YAP1/TAZ dans le développement de l’oviducte (Premier article)

<b>Figure 1.</b> – Müllerian ducts express YAP and TAZ and fertility of <i>Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup></i> females decreases with age in an ovary-independent manner.....	93
<b>Figure 2.</b> – <i>Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup></i> uterus is unaffected.....	94
<b>Figure 3.</b> – <i>Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup></i> mice develop oviductal dilations concomitant with myosalpinx thinning.....	95
<b>Figure 4.</b> – Loss of YAP and TAZ in the stroma and myosalpinx of <i>Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup></i> mice does not affect proliferation or apoptosis.....	97
<b>Figure 5.</b> – Oviductal dilations result in oocyte and embryo entrapment.....	98
<b>Figure 6.</b> – mRNA expression in <i>Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup></i> isthmi is only moderately affected.....	99

**Figure S1.** – The *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* model has poor recombination efficiency in its ovaries and uterus .....100

**Figure S2.** – Loss of YAP/TAZ does not result in the dysregulation of the TGF-β/SMAD pathway or the biogenesis of miRNAs.....101

**Figure S3.** – mRNA expression of Notch-related genes in *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* isthmi is not altered .....102

**Chapitre 4 – La voie Hippo dans l’ovulation (Second article)**

**Figure 1.** – The ovulatory signal activates the Hippo pathway in granulosa cells in vivo .....123

**Figure 2.** – LH activates the Hippo pathway in granulosa cells in vitro.....124

**Figure 3.** – LH acts via PKA to phosphorylate YAP1.....125

**Figure 4.** – Loss of *Yap1* and *Taz* blunts LH responsiveness.....126

**Figure 5.** – Loss of *Yap1/Taz* expression in murine granulosa cells negatively affects the expression of several ovulation-related genes.....127

**Figure 6.** – YAP1 is recruited to the *Areg* promoter following hCG stimulation .....128

**Figure 7.** – The Hippo pathway plays an essential role in the regulation of the LH cascade.....129

**Figure S1.** – PI3K/AKT and ERK1/2 pathways alone are not involved in the LH-dependent activation of the Hippo pathway in granulosa cells .....130

**Figure S2.** – The PI3K/AKT and ERK1/2 pathways do not synergistically act with PKA in the LH-dependent activation of the Hippo pathway in granulosa cells .....131

**Figure S3.** – Loss of *Yap1/Taz* blunts the granulosa cell response to 1- and 6-hour LH treatments .....132

**Chapitre 5 – Discussion**

**Figure 14.** – Système de recombinaison Cre-LoxP .....141

## Liste des abréviations

Les abréviations et noms complets des gènes inscrits dans cette liste sont basés sur la nomenclature du Mouse Genome Informatics (MGI) (MGI, 2021). Toutefois, par souci de clarté, certains gènes dont l'appellation non reconnue par le MGI est encore fortement répandue ont été conservés tels quels. Le nom français de certaines abréviations anglaises a été inscrit lorsqu'il est couramment utilisé (ex. : LH : hormone lutéinisante). Les familles de gènes qui contiennent plusieurs membres sont inscrites une seule fois avec un point d'interrogation remplaçant le chiffre de leur numérotation (ex. : Tead? : TEA domain family member ?). Les abréviations uniquement utilisées dans des figures sont précisées sous ces dernières.

20 $\alpha$ -HSD	20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase
3 $\beta$ -HSD	voir Hsd3b1
$\alpha$ -SMA	alpha smooth muscle actin
Acta2	actin alpha 2, smooth muscle
Actb	actin, beta ou $\beta$ -actin
Ad	adenovirus
Adamts1	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1
ADN	acide désoxyribonucléique
AKT	protéine kinase B
AMH	hormone anti-mullérienne
Amhr2	anti-Mullerian hormone type 2 receptor
Amot	angiomotin
AMPC	adénosine monophosphate cyclique ou AMP cyclique
Ankrd1	ankyrin repeat domain 1
ANOVA	analyse de la variance
AP-1	activator protein 1
Areg	amphiréguline
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
Axl	AXL receptor tyrosine kinase
$\beta$ -TRCP	voir Btrc

Bax	BCL2-associated X protein
Bcl2	B cell leukemia/lymphoma 2
Birc?	baculoviral IAP repeat-containing ?
Bmp	bone morphogenetic protein
BP	biological process
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine
BSA	bovine serum albumin
Btc	betacellulin
Btrc	beta-transducin repeat containing protein
C/EBP $\alpha$ et $\beta$	voir Cebp $\alpha$ /b
Cald1	caldesmon 1
Ccn1 ou Cyr61	cellular communication network factor 1
Ccn2 ou Ctgf	cellular communication network factor 2
Ccn3 ou Nov	cellular communication network factor 3
Ccnd2	cyclin D2
Cdk1	cyclin-dependent kinase 1
Cdkn1a/b	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A et 1B
Cdx2	caudal type homeobox 2
Cebpa/b	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha et beta
Cflar ou Flip	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
CG	cellule de la granulosa
ChIP	immunoprécipitation de la chromatine
CIHR ou IRSC	Instituts de Recherche en Santé du Canada
CK1	casein kinase 1
CL	corps jaune
c-Myc ou Myc	myelocytomatosis oncogene
Cnn1	calponin 1
CNP	C-type natriuretic peptide
COC	complexe cumulus-ovocyte
Cre	cyclic recombinase
Creb ou Creb1	cAMP responsive element binding protein 1
Ctgf	voir Ccn2
Ctnnb1	$\beta$ -caténine ou catenin (cadherin associated protein), beta 1
Ctsl	cathepsin L
Cxcl12 ou Sdf-1	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
Cyp??a1	cytochrome P450, family ??, subfamily a, polypeptide 1
Cyp19a1	aromatase ou cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1
Cyp26b1	cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1

Cyr61	voir Ccn1
d.p.c.	days post coitum
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
Ddx17	DEAD box helicase 17
DEG	gène différentiellement exprimé
Des	desmin
Dhh	desert hedgehog
Dicer1	dicer 1, ribonuclease type III
Dmc1	DNA meiotic recombinase 1
Dvl?	dishevelled segment polarity protein ?
eCG	equine chorionic gonadotropin
Edn2	endothelin 2
Egfr	epidermal growth factor receptor
Emx2	empty spiracles homeobox 2
Ereg	epiregulin
ERK1/2 ou Mapk1/3	extracellular signal-regulated kinase 1 et 2
Esr2	estrogen receptor 2
Fasl	fas ligand
FBS	fetal bovine serum
Fgf?	fibroblast growth factor ?
Foxl2	forkhead box L2
Foxo3	forkhead box O3
FRQS	Fonds de Recherche du Québec – Santé
FSH	hormone folliculo-stimulante
Fshr	follicle stimulating hormone receptor
FSK	forskoline
Gdf9	growth differentiation factor 9
GEO	gene expression omnibus
GFP	green fluorescent protein
GMPc	guanosine monophosphate cyclique ou GMP cyclique
GnRH	gonadotropin-releasing hormone
GO	gene ontology
Gsk3b	glycogen synthase kinase 3 beta
Has2	hyaluronan synthase 2
HBSS	Hank's balanced salt solution
hCG	human chorionic gonadotropin
Hif1a	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit

HMG-CoA	hydroxyméthylglutaryl-CoA
Hoxa?	homeobox A?
HPS	hematoxylin phloxine saffron
HRP	horse radish peroxidase
Hrt3 ou Heyl	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like
Hsd17b1	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1
Hsd3b?	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase ?
IHC	immunohistochimie
Ihh	indian hedgehog
Inha	inhibin alpha
Inhba	inhibin beta-A
IP	intra-péritonéal
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-trisphosphate
Itgb2	integrin beta 2
IU	unités internationales
Jagged1 ou Jag1.L	jagged 1 L homeolog
JASP	Jasplakinolide
Kdr ou Vegfr2	kinase insert domain protein receptor
Kit	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase
Kitl	kit ligand
Lats1/2	large tumor suppressor kinase 1 et 2
LH	hormone lutéinisante
Lhcgr	lutinizing hormone/choriogonadotropin receptor
Lhx1 ou Lim1	LIM homeobox protein 1
Lif	leukemia inhibitory factor
LoxP	locus of X-over P1
LPA	acide lysophosphatidique
Map4k	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase
Mapk8 ou JNK	mitogen-activated protein kinase 8 ou c-Jun N-terminal kinase
Max	max protein
Mef2c	myocyte enhancer factor 2C
Mek1/2 ou Map2k1/2	mitogen-activated protein kinase kinase 1 et 2
MEM	minimal essential medium
MGI	mouse genome informatics
miRNA ou microARN	micro ARN
mo	mois
Mob1a et 1b	MOB kinase activator 1A et 1B

MPF	maturation-promoting factor
Mst1/2	macrophage stimulating 1 et 2
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
Myf5	myogenic factor 5
Myh11	myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle
Myod1	myogenic differentiation 1
Myog	myogenin
Nf2	neurofibromin 2
NIH	National Institutes of Health
Nlk	nemo like kinase
Nov	voir Ccn3
Nppc	natriuretic peptide type C
Npr2	natriuretic peptide receptor 2
Nr0b1 ou Dax1	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1
Nr2f2 ou Coup-TFII	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2
Nr5a1 ou Sf-1	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1
P4	progestérone
Parp1	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1
Pax2	paired box 2
PBS	phosphate-buffered saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	réaction de polymérase en chaîne
Pde3a	phosphodiesterase 3A, cGMP inhibited
Pde4d	phosphodiesterase 4D, cAMP specific
Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1
Pfk1	phosphofructokinase 1
PGC	primordial germ cell
PGE2	prostaglandine E2
PGF2 $\alpha$	prostaglandine F2 $\alpha$
Pgr	progesterone receptor
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PIP <sub>2</sub>	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP <sub>3</sub>	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PKA	protéine kinase A
Plat	plasminogen activator, tissue
Plau	plasminogen activator, urokinase
Plk2	polo like kinase 2
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate

Ppar-γ ou Pparg	peroxisome proliferator activated receptor gamma
Prpf4b	pre-mRNA processing factor 4B
Pten	phosphatase and tensin homolog
Ptger2	prostaglandin E receptor 2
Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
Ptpn14	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14
Ptx3	pentraxin related gene
PVDF	hydrophilic polyvinylidene fluoride
qPCR	PCR quantitatif
Rpl19	ribosomal protein L19
Rspo?	R-spondin ?
RT	transcriptase inverse
Runx	runt related transcription factor
S1P	sphingosine-1-phosphate
Sav1	salvador family WW domain containing 1
SCF	Skp, Cullin, F-box containing complex
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error of the mean
Sfrp4	secreted frizzled-related protein 4
Ski	ski sarcoma viral oncogene homolog (avian)
Skil	ski-like
Smad?	SMAD family member ?
Smtn	smoothelin
Sox9	SRY (sex determining region Y)-box 9
Spo11	SPO11 initiator of meiotic double stranded breaks
Src	rous sarcoma oncogene
Srf	serum response factor
Sry	sex determining region of Chr Y
Star	steroidogenic acute regulatory protein
Stra8	stimulated by retinoic acid gene 8
STRIPAK	striatin-interacting phosphatase and kinase complex
Sult1e1	sulfotransferase family 1E, member 1
Sycp3	synaptonemal complex protein 3
Tagln	transgelin
Taok	TAO kinase
Taz ou Wwtr1	transcriptional co-activator with PDZ-binding motif
TBS	tris-buffered saline
TBST	TBS supplemented with 0.1% Tween 20



Tbx5	T-box 5
Tcf4	transcription factor 4
Tead?	TEA domain family member ?
Tfcp2	transcription factor CP2
Tgfb1	transforming growth factor, beta receptor I
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
Tnfaip6	tumor necrosis factor alpha induced protein 6
Top2a	topoisomerase (DNA) II alpha
Tsc1/2	TSC complex subunit 1 et 2
TSS	site d'initiation de la transcription
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
Vegfa	vascular endothelial growth factor A
Vgll?	vestigial like family member ?
VP	vertéporphine
wk	semaine
Wnt?	wingless-type MMTV integration site family, member ?
WT	wild-type
Xiap	X-linked inhibitor of apoptosis
Yap1 ou Yap	yes-associated protein 1
Yes1	YES proto-oncogene 1

# Remerciements

Plusieurs remerciements s'imposent.

À Derek, pour ta disponibilité inégalable, pour ta confiance et pour m'avoir laissé de plus en plus d'autonomie durant ma progression au PhD. Merci pour les séances de réflexion sur les prochaines étapes du projet; après tout, le « Ph » de PhD, c'est pour philosophie n'est-ce pas ? Ton laboratoire est une excellente école.

Aux membres passés (Gustavo, Charlène, Meggie, Mayra, Guillaume, Adrien, Manue, Amélie, Ariane, Anne-Laurence, Lauriane, Olivia) et présents (Vickie, Esdras, Nour, Franck, Michael, Florine) des laboratoires Boerboom, Boyer, Zamberlam, Paquet, Price et Murphy, pour l'entraide, pour l'atmosphère dans le laboratoire et pour nos activités sociales déjantées (soccer-golf, mini-putt, mariage de Mic prise 2, Sushi Matsu à volonté, cours d'initiation à l'escalade, sorties au Parc Les Salines, Fort Boyard de la medvet, rafting et j'en passe).

Au FRQS, aux Études supérieures et postdoctorales de l'UdeM et à la Faculté de médecine vétérinaire pour avoir permis un parcours aux études supérieures exempt de stress financier.

Au CRRF, au RQR et au SSR, pour les nombreuses opportunités d'ateliers, de formations et de conférences qui ont contribué à mon développement professionnel.

À ma famille, mes amis proches, Steph et Véro, pour avoir accepté initialement et pour continuer d'encourager mon côté intello. Merci pour votre soutien et votre amour.

## Avant-propos

La fonction du système reproducteur contraste avec celle des autres systèmes (cardiovasculaire, respiratoire, immunitaire, digestif, nerveux, etc.) du fait qu'elle n'est pas impliquée dans la survie de l'individu, mais est plutôt indispensable à la pérennité de l'espèce. Chez le mammifère femelle, les ovaires s'occupent de la production, de la maturation et de la libération synchrone des ovocytes, les cellules germinales femelles. Chaque ovocyte ovulé peut ensuite être fécondé par un spermatozoïde dans l'oviducte. L'embryon qui en résulte poursuit son développement dans l'utérus jusqu'à la mise-bas.

Selon les données les plus récentes de l'Agence de la santé publique du Canada (2019), un couple hétérosexuel canadien sur six souffre d'infertilité. Cette condition, définie par l'Organisation mondiale de la Santé par l'absence de grossesse après un an de rapports sexuels non-protégés réguliers, peut être de cause masculine, féminine, combinée ou inconnue. Les défauts de l'ovulation, le processus de libération de l'ovocyte qui survient une fois par cycle menstruel, sont impliqués dans 30% des cas d'infertilité féminine (Hakimi et Cameron, 2017).

Les thérapies présentement utilisées en médecine de la reproduction humaine se basent principalement sur deux gonadotrophines : l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH). L'emploi de la FSH (avec ou sans LH) est à la base de la plupart des protocoles de stimulation ovarienne et de traitement de l'infertilité (Lunenfeld, 2004). Considérées généralement efficaces, ces thérapies peuvent comporter certains effets indésirables. En raison du risque de développement d'ovaires polykystiques, d'ascite et d'œdème généralisé, le syndrome d'hyperstimulation ovarienne en est un exemple probant (Vloeberghs, Peeraer, Pexsters et D'Hooghe, 2009). Une approche alternative à la stimulation ovarienne actuelle consiste à développer des nouvelles thérapies ciblées qui agissent en aval des récepteurs aux gonadotrophines. Dans cette optique, une meilleure caractérisation des nombreux effecteurs impliqués dans la physiologie ovarienne s'avère indispensable car elle permettrait d'accroître notre capacité d'intervenir efficacement et sécuritairement dans le traitement de l'infertilité.

Initialement étudiée pour ses rôles dans l'organogenèse et l'oncogenèse, la voie de signalisation développementale Hippo est de plus en plus démontrée comme participant à l'homéostasie des tissus adultes. Plusieurs études ont rapporté son implication dans la physiologie ovarienne, notamment dans le recrutement folliculaire (Kawamura et al., 2013), dans la prolifération des cellules de la granulosa (Fu et al., 2014) et dans l'ovulation (Ji et al., 2017; Lv et al., 2019; Sun et Diaz, 2019). La voie Hippo contrôle la localisation intracellulaire de ses deux co-régulateurs transcriptionnels YAP1 et TAZ et, par le fait même, régule la transcription de ses gènes cibles.

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons utilisé des modèles murins transgéniques permettant la délétion de *Yap1* et de *Taz* dans les cellules de la granulosa ovarienne afin de mieux caractériser le rôle de ces effecteurs dans l'ovaire. À l'aide de plusieurs techniques de biologie moléculaire, nous sommes parvenus à préciser leur impact au niveau du protéome et du transcriptome des cellules de la granulosa murine.

La revue de la littérature se trouvant au [chapitre 1](#) de cette thèse présente les principaux régulateurs du développement du système reproducteur femelle et de la physiologie ovarienne. Elle brosse ensuite le portrait de la voie Hippo, de ses rôles classiques, de sa régulation, ainsi que de ses implications connues à ce jour dans le tractus reproducteur femelle. L'hypothèse et les objectifs de recherche sont présentés au [chapitre 2](#), tandis que les [chapitres 3](#) et [4](#) présentent deux articles scientifiques résultant des travaux de ce projet de thèse. Une discussion des limitations et défis rencontrés lors de la production de ces résultats, ainsi que de leur contribution à la recherche est présentée au [chapitre 5](#). Finalement, le [chapitre 6](#) offre une courte synthèse du projet de thèse.

## **Chapitre 1 – Revue de la littérature**

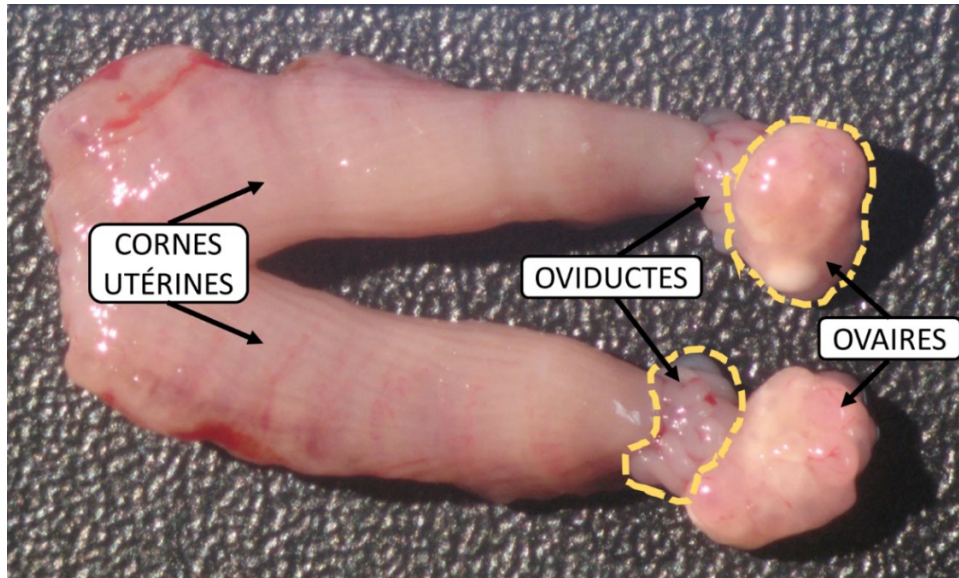
# **1. Système reproducteur femelle**

Le système reproducteur femelle constitue un ensemble d'organes unique et fascinant du fait de la pluralité de ses fonctions. Ce système permet la production, la maturation et la libération des gamètes femelles, la capacitation des gamètes mâles, ainsi que leur transport respectif. Il fournit un environnement adéquat pour la fertilisation, la nidation et le développement embryonnaire et permet l'expulsion des fœtus durant la mise-bas. Cette section présente l'anatomie, l'histologie, le développement et la physiologie des différents organes composant le tractus reproducteur femelle en s'attardant considérablement au processus de folliculogénèse.

## **1.1 Anatomie et histologie du système reproducteur murin femelle**

### **1.1.1 Ovaires**

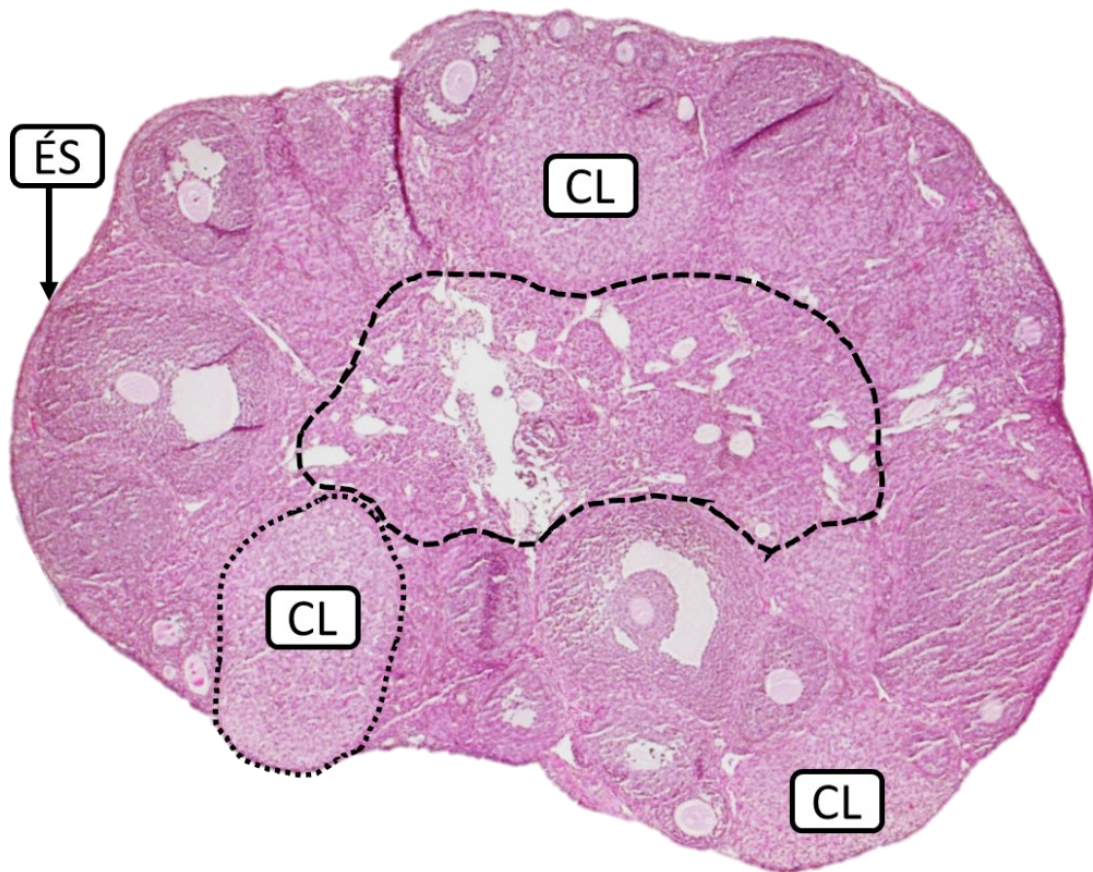
Les ovaires sont les gonades qui permettent la libération synchrone des ovocytes à chaque cycle estral. Ils ont la forme d'une fève et sont anatomiquement situés dans un amas de tissu adipeux caudalement aux reins, crânialement aux oviductes (Figure 1). L'ovaire est une glande endocrine étant donné son rôle important dans la sécrétion d'estrogènes et de progestérone dans la circulation sanguine. Sa vascularisation provient de l'artère ovarienne et d'une branche de l'artère utérine qui s'anastomosent et pénètrent par le hile de l'organe (Young, O'Dowd et Woodford, 2015). Chez les rongeurs, l'ovaire et la partie antérieure de l'oviducte sont enveloppés par une mince membrane, la bourse ovarienne, qui les isole de la cavité péritonéale et qui facilite la récupération des ovocytes ovulés (Robinson, 1887; Vanderhyden, Rouleau et Armstrong, 1986).



**Figure 1.** – Anatomie macroscopique du système reproducteur femelle murin

Histologiquement, l’ovaire est recouvert par un épithélium cuboïde, l’épithélium de surface, aussi appelé l’épithélium germinatif (Figure 2) (Young et al., 2015). En dessous, on retrouve une capsule de tissu conjonctif dense, la tunique albuginée, qui procure une structure rigide à l’organe (Young et al., 2015). Le cortex ovarien est la zone de l’ovaire qui contient les follicules, tandis que la médulla, au centre, contient les vaisseaux sanguins et lymphatiques (Figure 2) (Kawashima et Kawamura, 2018). Le follicule est l’unité fonctionnelle de l’ovaire. Bien que sa structure varie selon son niveau de développement (Figure 3), il est toujours constitué d’un ovocyte central enveloppé par une ou plusieurs couches de cellules somatiques. Les follicules primordiaux constituent le premier stade folliculaire (Figure 3A). Ils sont généralement situés directement sous la tunique albuginée et sont formés d’un ovocyte d’environ 25  $\mu\text{m}$  de diamètre recouvert par des cellules somatiques squameuses que l’on nomme pré-granulosa (Kawashima et Kawamura, 2018). Lorsque ces cellules somatiques deviennent cubiques, elles prennent le nom de cellules de la granulosa (CGs) et le follicule atteint ainsi le stade primaire (Figure 3B). Le follicule secondaire possède plusieurs couches de CGs en raison de leur prolifération (Figure 3C). À ce stade, une sous-population de cellules stromales se différencie alors en cellules de la thèque et forme ainsi la couche cellulaire la plus externe du follicule (Rimon-Dahari, Yerushalmi-Heinemann, Alyagor et Dekel, 2016). Pendant la croissance folliculaire, la thèque se différencie en deux zones distinctes; la thèque interne, qui contient les cellules

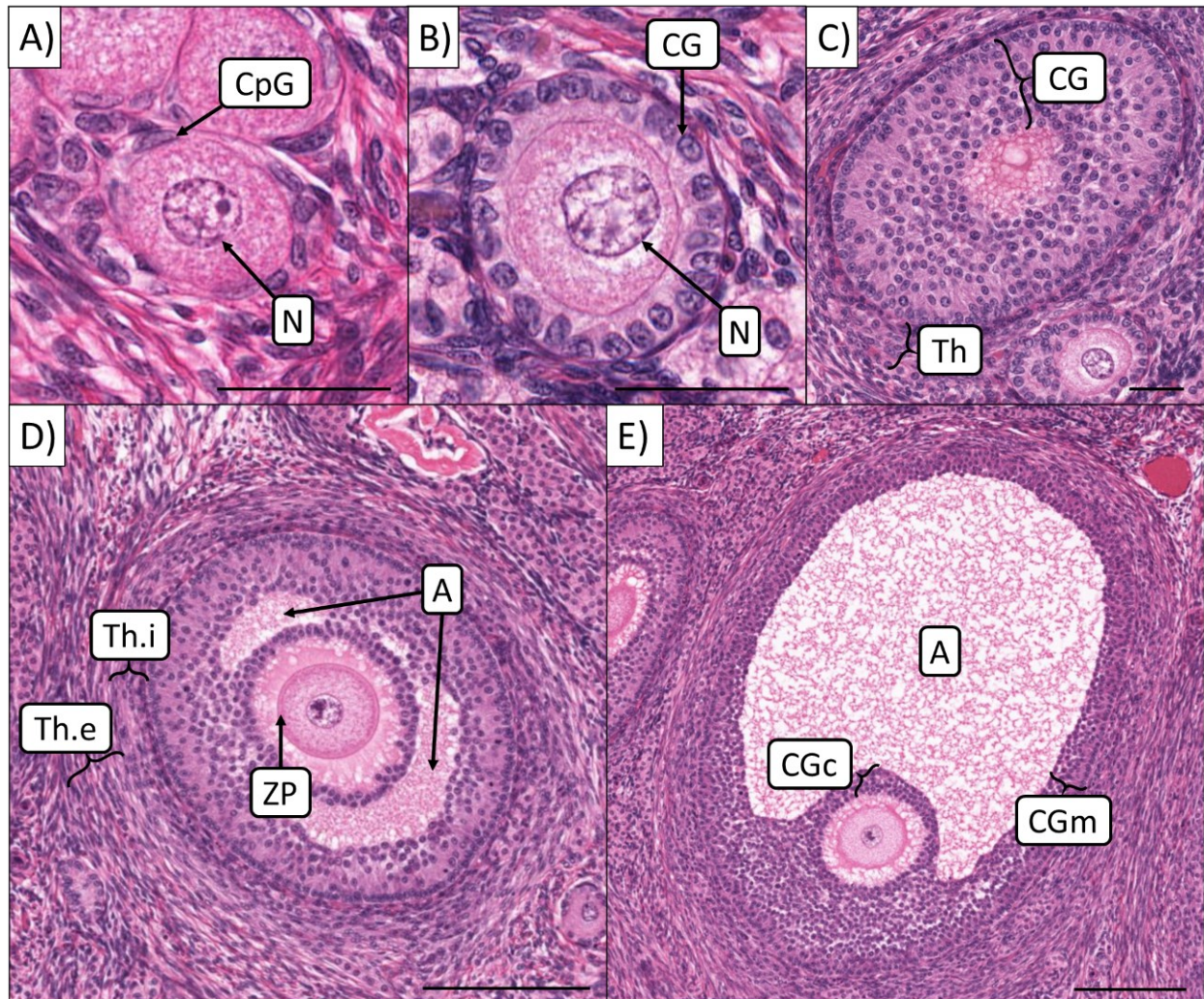
endocrines, et la thèque externe, formée de tissu conjonctif (Figure 3D) (Edson, Nagaraja et Matzuk, 2009). Les CGs et de la thèque sont séparées par une membrane basale. Les follicules antraux sont caractérisés par la présence d'une cavité liquidienne (antre folliculaire) entre les CGs (Figure 3D). C'est à partir de ce moment que l'on distingue deux sous-populations de CGs; les granulosa murales qui deviendront des cellules lutéales après l'ovulation et les cellules du cumulus, entourant l'ovocyte, qui seront ovulées avec ce dernier (Edson et al., 2009). Histologiquement indifférenciable d'un gros follicule antral, le follicule pré-ovulatoire (Figure 3E) est un follicule ayant la capacité d'ovuler en présence d'un signal ovulatoire suffisant. Le corps jaune (CL pour *corpus luteum*) est la structure stéroïdogène résultant de la différenciation finale des CGs et de la thèque en cellules lutéales (Stocco, Telleria et Gibori, 2007).



**Figure 2.** – Ovaire murin adulte en coupe histologique

La ligne pointillée délimite un corps jaune. La ligne formée par une succession de tirets délimite le cortex (externe) de la médulla (interne). CL=Corps jaune, ÉS=Épithélium de surface.





**Figure 3.** – Follicules ovariens humains à différents stades de la folliculogénèse

A) Follicule primordial. B) Follicule primaire. C) Petit et gros follicules secondaires. D) Petit follicule antral. E) Gros follicule antral, possiblement pré-ovulatoire. N=Noyau, CpG=Cellule de pré-granulosa, CG=Cellule de la granulosa, Th=Thèque, Th.i=Thèque interne, Th.e=Thèque externe, A=Antre, ZP=Zone pellucide, CGc=CG du cumulus, CGm=CG murales. Les barres d'échelle mesurent 50 (A,B,C) et 200 (D,E)  $\mu\text{m}$ . Images capturées à partir de la lame « *MHS 259 Ovary* » du *Histology Guide* virtuel (Brelje et Sorenson, 2021).

### 1.1.2 Oviductes

Situés de chaque côté, entre l'ovaire et la corne utérine (Figure 1), les oviductes captent les ovocytes après l'ovulation. Ils permettent le transport antérograde des spermatozoïdes au lieu de fécondation et le transport rétrograde de l'embryon vers l'utérus. L'oviducte est un organe tubulaire longiligne circonvolé dont la vascularisation provient des artères ovariennes et utérines (Stewart et Behringer, 2012). Sa paroi est formée d'un épithélium pseudostratifié cilié avec cellules sécrétrices, d'un mince stroma, d'un myosalpinx composé d'une couche musculuse circulaire interne et d'une longitudinale externe et d'une séreuse (mésothélium). L'épithélium forme des replis longitudinaux qui sont plus importants dans les segments antérieurs. L'oviducte est divisé en quatre segments. Les deux premiers, l'infundibulum et l'ampoule sont indifférenciables histologiquement. Leur paroi est mince et leur épithélium est majoritairement constitué de cellules ciliées. Le troisième segment, l'isthme, possède une paroi plus large, une lumière réduite et son épithélium est principalement formé de cellules sécrétrices. Le myosalpinx est beaucoup plus épais dans l'isthme que dans l'ampoule, ce qui explique la différence dans l'épaisseur de leur paroi. Enfin, la portion intramurale est la section de l'oviducte qui pénètre la corne utérine, elle est histologiquement similaire à l'isthme.

### 1.1.3 Utérus

L'utérus est le site de nidation des embryons, il fournit un environnement optimal pour la croissance fœtale et permet l'expulsion des nouveau-nés lors de la mise-bas. Il joue un rôle important dans le transport et la capacitation des spermatozoïdes et sa sécrétion de prostaglandines contribue à la cyclicité du cycle estral. La morphologie utérine varie énormément chez les mammifères (Cooke, Spencer, Bartol et Hayashi, 2013). Chez la souris, l'utérus mesure environ deux centimètres de long et possède une conformation double (*duplex uterus*), c'est-à-dire qu'il est formé de deux longues cornes (Figure 1) qui se fusionnent caudalement en un petit corps utérin (Ruberte, Carretero et Navarro, 2017). Les cornes utérines supportent le développement de plusieurs fœtus simultanément. Le col utérin est double en portion antérieure et simple en portion caudale (Cooke et al., 2013). Cette particularité anatomique prévient le mouvement des fœtus entre les cornes utérines. Anatomiquement situé entre la vessie, ventralement, et le côlon, dorsalement, l'utérus est suspendu à la paroi abdominale dorsale par

un ligament large qui contient les nerfs et les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Il est vascularisé par l'artère utérine et par la branche utérine de l'artère ovarienne (Ruberte et al., 2017).

Histologiquement, la paroi utérine est formée de 3 sections : l'endomètre, le myomètre et le périmètre (Cooke et al., 2013). La section la plus interne, l'endomètre, est formée d'un épithélium simple cylindrique et d'un chorion qui contient des glandes endométriales. Le myomètre est constitué des deux mêmes couches que dans le myosalpinx. Celles-ci sont bien différenciables histologiquement par la présence d'une couche de tissu conjonctif hautement vascularisé entre les deux. Le périmètre est la section la plus externe, il s'agit d'une séreuse formée par un mésothélium simple.

## **1.2 Développement du système reproducteur femelle**

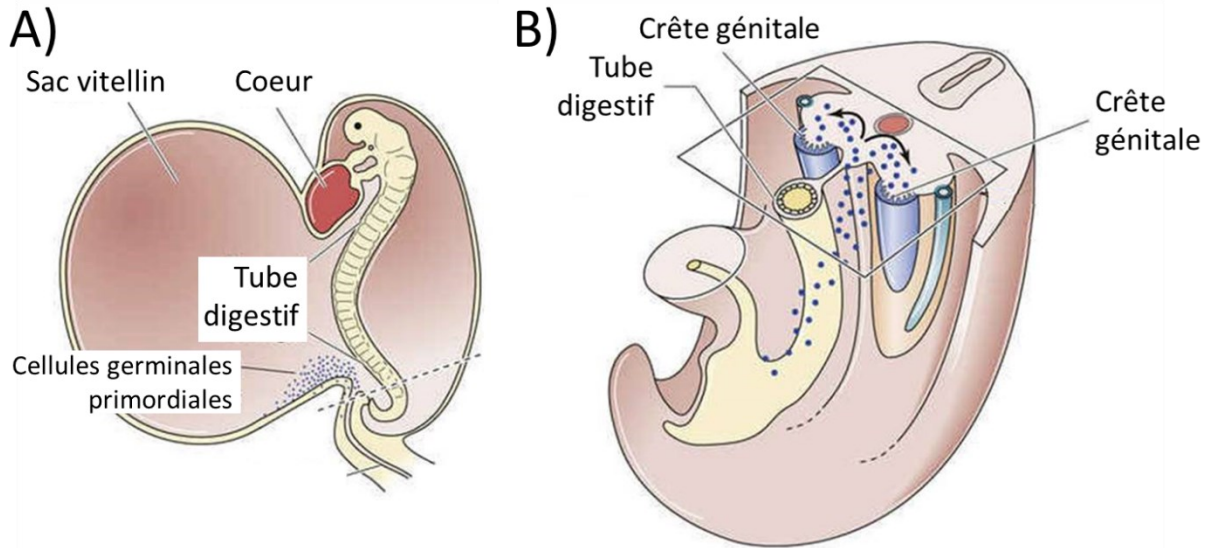
### **1.2.1 Ovogenèse et développement des gonades femelles**

L'ovogenèse chez le mammifère est divisée en deux phases distinctes. La première, discutée ici, permet le développement embryonnaire des ovaires et l'établissement de la réserve de follicules primordiaux. La seconde, discutée dans la [section 1.3](#), débute par l'activation des follicules primordiaux et se termine par l'ovulation d'ovocytes matures et fertilisables.

La gamétogénèse débute au jour embryonnaire 5,5 chez la souris. À ce stade, l'expression de plusieurs membres de la famille des BMPs (BMP2, BMP4, BMP8B) conduit au développement de la première population de cellules germinales, les cellules germinales primordiales (PGCs pour *primordial germ cells*), à partir de l'ectoderme extra-embryonnaire (Figure 4A) (Edson et al., 2009; Lawson et al., 1999; McLaren, 2003; Saitou et Yamaji, 2012; Ying, Qi et Zhao, 2001). Les PGCs sont des cellules diploïdes pluripotentes précurseurs des cellules germinales mâles (spermatozoïdes) ou femelles (ovocytes). Les BMPs et WNT3 sont des facteurs importants pour le maintien de la pluripotentialité et pour la prévention de l'initiation de la différenciation des PGCs (Wear, McPike et Watanabe, 2016).

Étant issues du tissu extra-embryonnaire, les PGCs doivent migrer afin de coloniser les gonades. Autour du jour embryonnaire 10,5, celles-ci atteignent la crête génitale (Figure 4B) – l'ébauche gonadique – après avoir suivi le signal chimiotactique du CXCL12 (aussi SDF-1)

(Molyneux, Stallock, Schaible et Wylie, 2001; Richardson et Lehmann, 2010). La signalisation KITL/KIT est elle aussi nécessaire à la migration des PGCs (Gu, Runyan, Shoemaker, Surani et Wylie, 2009; McLaren, 2003).



**Figure 4.** – Migration des cellules germinales primordiales durant l'embryogenèse

Localisation des cellules germinales primordiales (cellules bleues) avant (A) et durant (B) leur migration vers les crêtes génitales. Images adaptées à partir de la figure 53-4 dans (Mesiano et Jones, 2017).

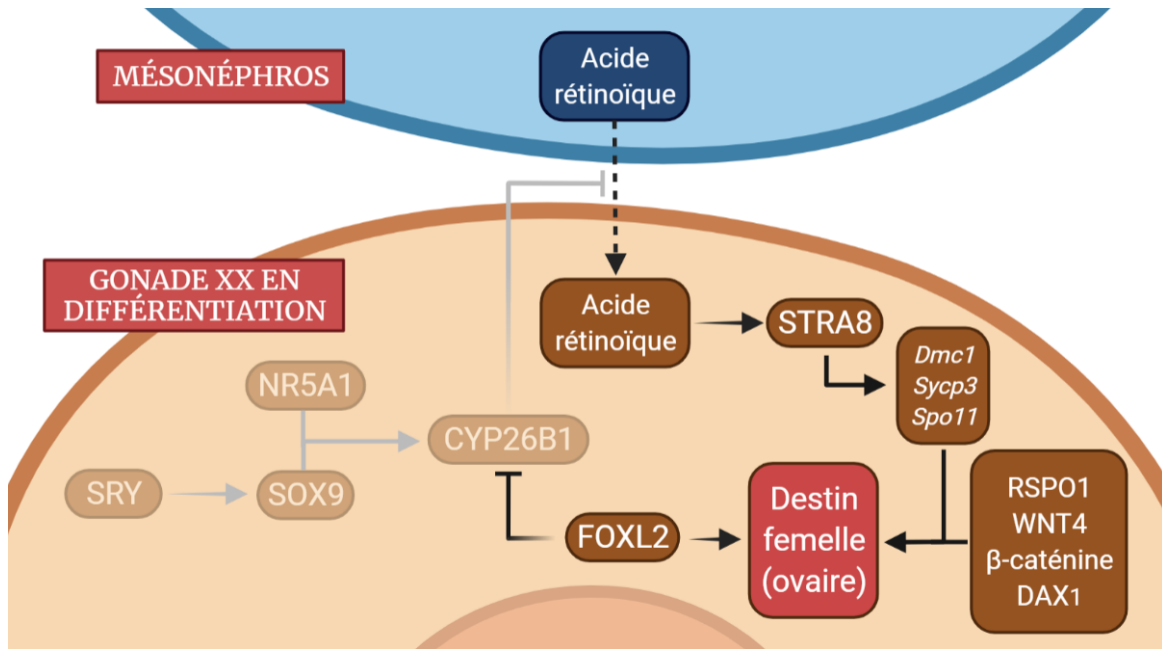
Durant leur migration, les PGCs entrent dans une phase de prolifération mitotique (Ginsburg, Snow et McLaren, 1990). Cette étape dure jusqu'au jour embryonnaire 14,5 (Lei et Spradling, 2013; Pepling et Spradling, 1998). La différenciation sexuelle débute durant cette période (Figure 5). Chez les mammifères, l'expression du gène *Sry*, localisé sur le chromosome Y, conduit au destin reproducteur mâle (Koopman et Gubbay, 1991). Son absence, même chez un embryon XY, entraîne les cellules germinales primordiales vers un destin ovocytaire (Brennan et Capel, 2004; Lovell-Badge et Robertson, 1990). *Sry* induit l'expression du facteur de différenciation mâle SOX9 (Rimon-Dahari et al., 2016). Ce dernier, en collaboration avec NR5A1 (aussi SF1), induit l'expression du gène *Cyp26b1* (Kashimada et al., 2011). Durant cette période, le mésonéphros produit de l'acide rétinoïque qui, chez le mâle, est clivé par l'enzyme CYP26B1



(Gobé et Mandon-Pépin, 2019). Ce processus contribue à la différenciation des PGCs en cellules germinales mâles (Figure 5 – effecteurs en transparence).

Chez un embryon XX, en absence de sécrétion de facteurs spécifiques au mâle, le développement gonadique tend naturellement vers un destin femelle (Figure 5). Cela s'effectue notamment grâce à l'expression de RSPO1 (Chassot et al., 2012), WNT4 (Chassot et al., 2012; Vainio, Heikkila, Kispert, Chin et McMahon, 1999),  $\beta$ -caténine (CTNNB1) (Maatouk et al., 2008) et NROB1 (aussi DAX1) (Swain, Narvaez, Burgoyne, Camerino et Lovell-Badge, 1998). FOXL2 est un facteur de transcription exprimé par les cellules somatiques précurseurs des CGs à partir du jour embryonnaire 11,5 (Gobé et Mandon-Pépin, 2019). Son expression antagonise l'induction de *Cyp26b1* (Kashimada et al., 2011). En absence de CYP26B1, l'acide rétinoïque s'accumule et induit l'expression de *Stra8*, un gène clé dans l'activation de plusieurs facteurs essentiels pour l'entrée des cellules en méiose tels que *Dmc1*, *Sycp3* et *Spo11* (Gobé et Mandon-Pépin, 2019; Wear et al., 2016). Cette entrée en méiose des cellules germinales femelles qui survient aux environs du jour embryonnaire 13,5 est un point tournant de la différenciation sexuelle chez la souris (Ewen et Koopman, 2010).

Les cellules germinales femelles différenciées sont appelées ovogonies. Leur prolifération mène à la formation de grappes ovocytaires, qui sont constituées d'amas d'ovogonies interconnectées par des ponts intercellulaires à la suite d'une cytokinèse incomplète. Ces grappes ovocytaires sont entourées de cellules somatiques épithéliales de pré-granulosa. À ce stade, la méiose ovocytaire est interrompue au stade diplotène de la prophase 1 (Pan et Li, 2019). Chez la souris, environ au deuxième jour postnatal, la fragmentation des grappes ovocytaires mène à la formation de la réserve de follicules primordiaux contenant entre 7 000 et 10 000 follicules (Kerr, Myers et Anderson, 2013; Lei et Spradling, 2013; Myers et al., 2014). La déplétion de ce nombre limité de follicules est le facteur définissant la fin de la vie reproductive de la femelle.



**Figure 5.** – Principaux effecteurs dans la différenciation sexuelle d'un embryon XX

Chez l'embryon XX, l'absence d'expression du gène *Sry*, combinée à l'expression du gène *Foxl2*, entraîne de faibles niveaux de l'enzyme CYP26B1. Ceci induit l'accumulation de l'acide rétinol produit par le mésonephros et l'expression de *Stras8*, un gène clé pour l'expression de plusieurs facteurs essentiels à l'entrée des cellules en méiose. Plusieurs autres effecteurs tels que Rspo1, Wnt4, β-caténine et Dax1 contribuent aussi à la différenciation sexuelle féminine. Les effecteurs en transparence sont plus fortement exprimés lors de la différenciation sexuelle d'un embryon XY.

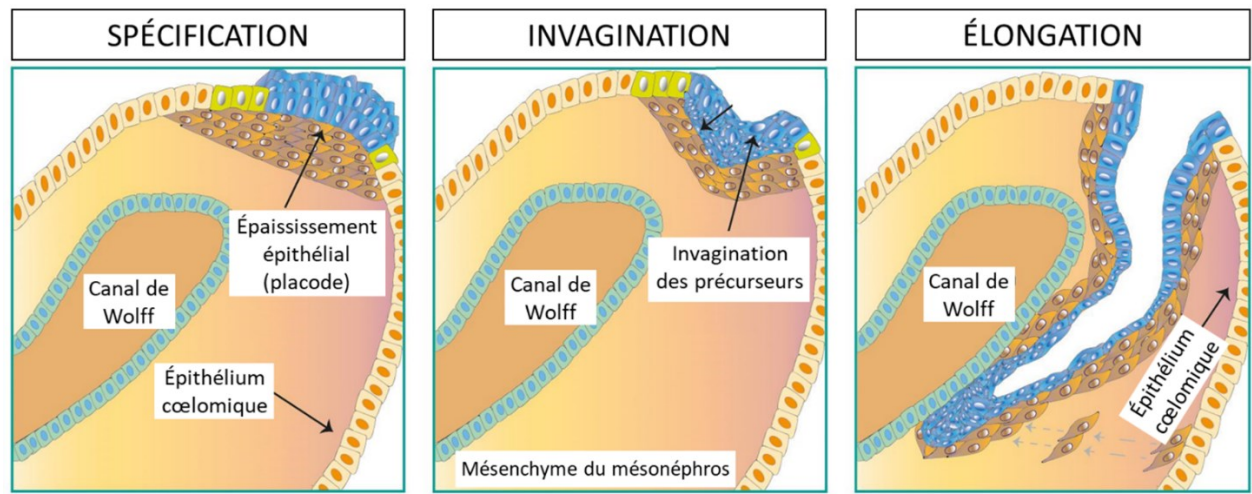
## 1.2.2 Développement du tractus reproducteur femelle

### 1.2.2.1 Embryonnaire

Durant l'embryogenèse, avant la différenciation sexuelle, l'embryon possède une paire de canaux de Wolff et une paire de canaux de Müller qui sont les structures embryonnaires qui formeront les tractus reproducteurs mâle et femelle respectivement. Chez le mâle, l'expression du gène *Sry* conduit à la différenciation des cellules de Sertoli qui produisent l'hormone anti-mullérienne (AMH) (Stewart et Behringer, 2012). La liaison de l'AMH sur son récepteur de type II (AMHR2), exprimé par le mésenchyme des canaux de Müller, conduit à la régression de ces derniers chez l'embryon mâle (Stewart et Behringer, 2012). Chez l'embryon femelle, en absence

d'AMH, les canaux de Müller sont conservés et donneront lieu, chez l'adulte, aux oviductes, à l'utérus et à la portion antérieure du vagin. L'absence de signaux testiculaires chez la femelle prévient le développement subséquent du canal de Wolff, qui régresse par la suite par un processus impliquant le facteur de transcription NR2F2 (aussi COUP-TFII) (Zhao et al., 2017).

Le développement des canaux de Müller débute aux environs du jour embryonnaire 11,75 par la spécification de précurseurs des canaux au pôle crânial du mésonéphros (rein embryonnaire) (Figure 6) (Guioli, Sekido et Lovell-Badge, 2007; Santana Gonzalez et al., 2021). L'expression des facteurs de transcription *Pax2*, *Emx2* et *Lhx1* (aussi *Lim1*), ainsi que de *Wnt4* est nécessaire à leur spécification à ce stade (Santana Gonzalez et al., 2021). Ces précurseurs forment un épaissement épithélial (placode) et s'invaginent dans le mésenchyme sous-jacent par la suite (Jacob, Konrad et Jacob, 1999; Orvis et Behringer, 2007). Les canaux s'allongent ensuite caudalement jusqu'à atteindre le sinus urogénital par un processus qui implique l'action de WNT9B (Carroll, Park, Hayashi, Majumdar et McMahon, 2005). Les canaux de Müller sont formés d'un mince épithélium entouré d'un mésenchyme.



**Figure 6.** – Développement embryonnaire du tractus reproducteur femelle

Le développement des canaux de Müller comprend les phases de spécification de précurseurs, d'invagination dans le mésenchyme et d'élongation des canaux. Les cellules bleues et brunes formeront l'épithélium et le mésenchyme du canal de Müller, respectivement. Images adaptées à partir des figures 1 et 2 dans (Santana Gonzalez et al., 2021).

### 1.2.2.2 Postnatal

Chez la souris, la différenciation des canaux de Müller dans les différents segments du tractus reproducteur débute après la naissance sous l'influence des gènes de la famille Homeobox (*Hoxa9* dans l'oviducte, *Hoxa10* et *11* dans l'utérus, *Hoxa13* dans le vagin) (Taylor, Vanden Heuvel et Igarashi, 1997) et de *Wnt7a* (Miller et Sassoon, 1998; Parr et McMahon, 1998). Chacun des segments du tractus reproducteur se différencie par des mécanismes qui lui sont propres.

L'enroulement de l'oviducte se caractérise par sa modification spatiale à partir du canal de Müller linéaire à une structure formant plusieurs courbes serrées à l'âge adulte. La cascade de signalisation exacte nécessaire à cet enroulement est présentement inconnue, mais impliquerait la voie Hedgehog (Migone et al., 2012) et la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Parr and McMahon, 1998, Deutscher and Hung-Chang Yao, 2007). Les cellules mésenchymateuses du canal de Müller se différencient en une mince couche de cellules stromales et en deux couches de cellules musculaires lisses après la naissance. L'épithélium du canal de Müller est un épithélium simple formé de cellules cuboïdes indifférenciées (Stewart et Behringer, 2012). Ce dernier se différencie en période postnatale pour former un épithélium pseudostratifié constitué de cellules ciliées et de cellules sécrétrices. La proportion de ces deux types cellulaires varie selon la localisation dans l'oviducte, passant de majoritairement cilié dans l'infundibulum à principalement formé de cellules sécrétrices dans l'isthme. C'est le mésenchyme sous-jacent qui, durant la première semaine suivant la naissance, est responsable de la différenciation des cellules épithéliales indifférenciées en un des deux types cellulaires (Yamanouchi et al., 2010).

À la naissance, l'utérus murin est formé d'un épithélium luminal simple et d'un mésenchyme indifférencié dépourvu de glandes endométriales (Gray et al., 2001). Durant les premiers jours de vie, les cellules du mésenchyme s'orientent et une sous-population se différencie en cellules musculaires lisses des couches circulaire et longitudinale (Brody et Cunha, 1989). La voie TGF- $\beta$  est impliquée dans cette organisation du myomètre (Gao, Bayless et Li, 2014). À l'âge adulte, les glandes endométriales sécrètent des facteurs de survie et de développement importants pour l'embryon tels que le LIF, un facteur clé dans la nidation et la décidualisation (Stewart et Cullinan, 1997). La formation des glandes endométriales nécessite la prolifération de l'épithélium luminal et son invagination dans le mésenchyme sous-jacent (Gray



et al., 2001). Ce processus nécessite plusieurs effecteurs de la voie Wnt ou interagissant avec celle-ci (Cooke et al., 2013; Hayashi et al., 2011; St-Jean, Boyer, et al., 2019). Tous ces processus sont complétés dans les deux premières semaines de vie (Hu, Gray et Spencer, 2004).

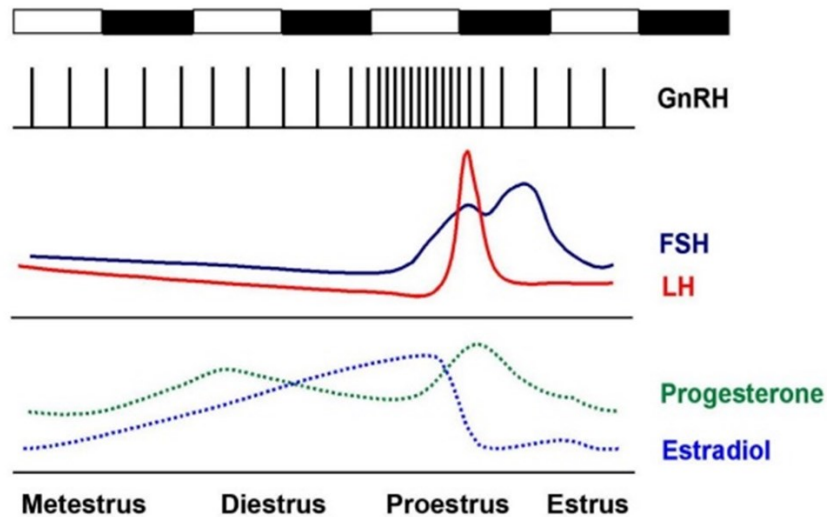
### **1.3 Physiologie ovarienne**

Le but ultime de l'ovaire est de permettre la croissance et la sélection des follicules jusqu'au stade où ces derniers ovuleront afin de libérer des ovocytes fertilisables par les spermatozoïdes. À partir de la maturité sexuelle, les ovaires ovulent à intervalle régulier selon le cycle estral de l'animal jusqu'à l'épuisement de la réserve folliculaire. Les corps jaunes, structures résultant de la rupture des follicules, supportent la gestation par la production de progestérone. Au courant de sa vie reproductive active, plusieurs mécanismes de signalisation (hormonaux, physiques, chimiques) permettent la coordination de la physiologie ovarienne chez la souris.

#### **1.3.1 Cycle estral**

Le cycle reproducteur de la souris dure en moyenne quatre à cinq jours (Ajayi et Akhigbe, 2020; Miller et Takahashi, 2013). On le nomme cycle estral, car il est caractérisé par l'estrus, une courte période d'acceptation de la monte du mâle par la femelle. Le cycle estral est contrôlé par l'axe gonadotrope (*HPG axis* en anglais pour *hypothalamic-pituitary-gonadal axis*). La production et le contrôle de la sécrétion des principales hormones reproductives (GnRH, FSH, LH, estradiol et progestérone) sont régulés par cet axe. Le cycle estral est divisé en quatre phases selon des fluctuations hormonales caractéristiques (Figure 7) (Bertolin et Murphy, 2014). La phase du cycle estral murin peut être efficacement déterminée de manière peu invasive par l'évaluation des sous-populations cellulaires à la cytologie vaginale (Byers, Wiles, Dunn et Taft, 2012). Durant les 48 à 72 heures que durent les phases de metestrus et de diestrus, les niveaux sériques de progestérone sont élevés par la présence de corps jaunes fonctionnels, ce qui entraîne des changements dans l'utérus afin de permettre la nidation des embryons (Bertolin et Murphy, 2014). Durant cette période, les niveaux en estradiol augmentent graduellement par la croissance folliculaire (Figure 7). L'estradiol atteint un maximum durant le proestrus (Richards, 1980) et accélère la sécrétion pulsatile de GnRH, ce qui se solde en une augmentation drastique des niveaux de LH (Stamatiades et Kaiser, 2018) et marque le début de la phase d'estrus (Figure 7).

En réponse à ce signal, les follicules pré-ovulatoires libèrent leur ovocyte, se lutéinisent et formeront les prochains corps jaunes. La sécrétion de FSH augmente également, ce qui initie une nouvelle vague de croissance folliculaire (Figure 7). La souris femelle ovule spontanément à chaque estrus et atteint la maturité sexuelle vers 6-7 semaines d'âge (Bertolin et Murphy, 2014).



Les barres horizontales blanches et noires dans le haut de la figure représentent le jour et la nuit, respectivement. Image adaptée à partir de la figure 1 dans (Miller et Takahashi, 2013).

Les gonadotrophines sont un groupe d'hormones glycoprotéiniques hétéro-dimériques comprenant la FSH et la LH. Elles possèdent une sous-unité alpha commune et une sous-unité bêta spécifique. Leur synthèse et leur sécrétion s'effectuent par les cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure en réponse à la stimulation par la GnRH produite par des neurones hypothalamiques. Une stimulation pulsatile à fréquence lente favorise la production de FSH, tandis qu'une sécrétion pulsatile à fréquence rapide favorise la LH (Ferris et Shupnik, 2006).

La manipulation du cycle estral murin par l'injection de gonadotrophines est fréquemment utilisée dans l'étude de la physiologie ovarienne. L'administration d'eCG (un analogue de la FSH chez la souris) entraîne la croissance d'une importante vague folliculaire. Quarante-huit heures plus tard, l'administration d'hCG (un analogue de la LH) permet l'ovulation d'un nombre élevé de

follicules. L'utilisation universelle de ces gonadotrophines dans la communauté scientifique permet une meilleure concertation des efforts de recherche et un partage plus efficace des résultats.

### 1.3.2 Folliculogénèse

La folliculogénèse désigne les processus de croissance et de maturation des follicules primordiaux jusqu'au stade pré-ovulatoire où ces derniers sont en mesure de répondre au signal ovulatoire. Malgré les quelques modifications subies par l'ovocyte (augmentation de volume, formation de la zone pellucide, modification de l'expression génique), le développement folliculaire est beaucoup plus marqué dans les CGs et de la thèque. La majorité des follicules entrent en atresie durant ce processus. Cette section passe en revue, les principaux effecteurs autocrins, paracrins et endocrins impliqués dans la folliculogénèse. Dans cette thèse, elle est divisée en trois portions. Le recrutement folliculaire et la croissance folliculaire du stade primaire au stade secondaire sont indépendants de l'action des gonadotrophines, tandis que ces dernières sont indispensables pour la croissance folliculaire antrale.

#### 1.3.2.1 Recrutement folliculaire

Le recrutement des follicules primordiaux de la réserve folliculaire désigne leur sortie d'un état de quiescence – pouvant durer plusieurs mois chez la souris – et leur croissance vers le stade primaire. Cette activation folliculaire est caractérisée par l'augmentation du diamètre de l'ovocyte et la transformation des cellules de pré-granulosa pavimenteuses en CGs cubiques (Figure 8) (Rimon-Dahari et al., 2016). Les avancées dans la caractérisation de ce phénomène sont bénéfiques pour plusieurs domaines de recherche tels que le traitement de l'insuffisance ovarienne prématurée et la préservation de la fertilité pendant un traitement chimiothérapeutique. Cette activation des follicules est un processus indépendant de l'action des gonadotrophines. Le principal mécanisme impliqué dans le recrutement folliculaire est par l'activation de la cascade de signalisation PI3K-AKT-FOXO3 (Figure 8). Dans l'ovocyte, l'activation de la PI3K conduit à la phosphorylation du PIP<sub>2</sub> en PIP<sub>3</sub>, qui par la suite entraîne la phosphorylation d'AKT par PDK1 (Rimon-Dahari et al., 2016). PTEN est une enzyme qui catalyse la déphosphorylation de PIP<sub>3</sub> en PIP<sub>2</sub> et qui prévient ainsi l'activation en aval d'AKT (Hsueh,

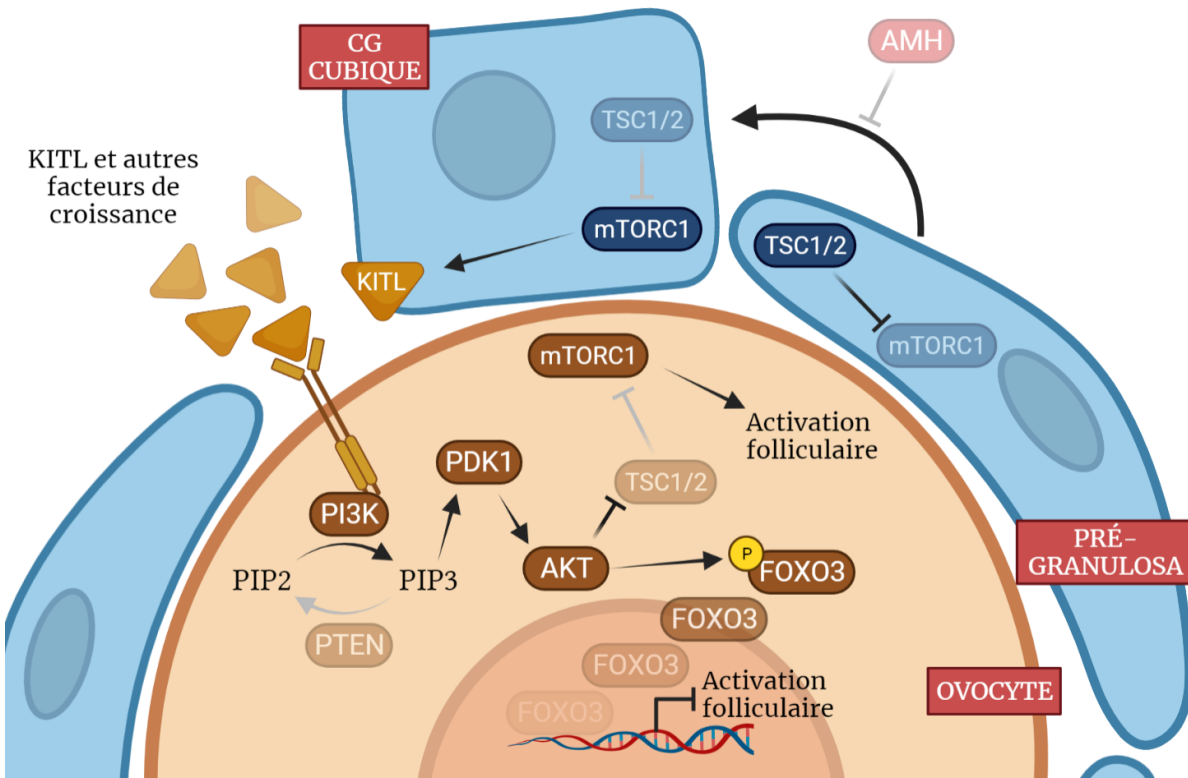
Kawamura, Cheng et Fauser, 2015). La localisation nucléaire du facteur de transcription FOXO3 est le principal mécanisme de maintien des follicules dans un stade de quiescence. L'activation d'AKT favorise le recrutement folliculaire par la phosphorylation de FOXO3, ce qui entraîne sa translocation cytoplasmique (John, Gallardo, Shirley et Castrillon, 2008). Un autre mécanisme nécessaire au maintien des follicules primordiaux en dormance est par l'inhibition constante de l'activité du complexe mTORC1 par TSC1/2 (Sanchez et Smitz, 2012).

En ce sens, l'inhibition génique de *Foxo3* (Castrillon, Miao, Kollipara, Horner et DePinho, 2003; Hosaka et al., 2004), *Pdk1* (Reddy et al., 2009), *Pten* (Reddy et al., 2008), *Tsc1* (Adhikari et al., 2010) ou *Tsc2* (Adhikari et al., 2009) chez la souris entraîne l'activation massive de la réserve folliculaire avant l'âge adulte et l'insuffisance ovarienne prématurée.

Plusieurs facteurs extra-ovocytaires tels que les neurotrophines (Nilsson, Dole et Skinner, 2009; Ojeda, Romero, Tapia et Dissen, 2000), le VEGFA (Roberts et al., 2007), le LIF (Nilsson, Kezele et Skinner, 2002), le FGF2 (Nilsson, Parrott et Skinner, 2001), le FGF7 (aussi KGF) (Kezele, Nilsson et Skinner, 2005) et le KITL (Parrott et Skinner, 1999) ont été identifiés comme régulateurs additionnels de l'activation folliculaire. L'activation de mTORC1 dans les cellules de pré-granulosa entraîne leur différenciation en CGs cubiques et stimule la production de KITL (Figure 8) (Zhang, Risal, et al., 2014). L'activation du récepteur KIT à la membrane ovocytaire entraîne l'activation d'AKT dans l'ovocyte (Jin et al., 2005; Reddy et al., 2005) et favorise la localisation cytoplasmique de FOXO3 (Ezzati et al., 2015).

L'AMH est produite par les CGs à partir du stade primaire et est un régulateur important du maintien des follicules en quiescence (Figure 8) (Durlinger et al., 2002; Durlinger et al., 1999). Son mécanisme d'action sur les follicules primordiaux est encore imparfaitement décrit, mais certaines études suggèrent que son action serait médiée par l'inhibition de la signalisation KITL (Hu et al., 2014; Nilsson, Rogers et Skinner, 2007).

Présentement, les mécanismes permettant l'activation d'une simple fraction des follicules primordiaux de la réserve à chaque cycle reproducteur restent encore incompris. Une hypothèse prometteuse propose le gradient de rigidité ovarien entre sa région corticale et médullaire comme facteur environnemental clé dans cette activation sélective (Woodruff et Shea, 2011).



**Figure 8.** – Principaux effecteurs impliqués dans le recrutement des follicules primordiaux

L'activation de la cascade PI3K-AKT-FOXO3 est le principal mécanisme de recrutement des follicules primordiaux. L'activation d'AKT entraîne la translocation de FOXO3 vers le cytoplasme ovocytaire, soulevant ainsi l'effet inhibiteur de ce dernier sur l'activation folliculaire. Par son effet inhibiteur sur TSC1/2, l'activation d'AKT entraîne aussi l'activation des follicules primordiaux par l'expression accrue de mTORC1. Dans les cellules de la granulosa (bleues), l'activation de mTORC1 permet la transformation des cellules de pré-granulosa pavimenteuses en CGs cubiques. Plusieurs facteurs extra-ovocytaires, dont le KITL et l'AMH, sont aussi impliqués dans la régulation de l'activation folliculaire. Les effecteurs en transparence sont plus fortement exprimés lorsque les follicules sont en quiescence.

### 1.3.2.2 Croissance du stade primaire au stade secondaire

Cette étape de croissance est marquée par la prolifération des CGs pour former plusieurs couches cellulaires, la production d'une membrane basale et le recrutement des précurseurs des cellules de la thèque. Tout comme lors du recrutement folliculaire, la plupart des signaux de croissances sont intra-folliculaires. Bien que FSHR soit exprimé dans les CGs dès le stade primaire (Hsueh et al., 2015), la FSH n'est nécessaire au développement folliculaire qu'à partir de la

transition secondaire-antrale (Abel et al., 2000). Il a été élégamment suggéré que la sécrétion de facteurs de croissance d'origine ovocytaire est un mécanisme efficace de prévention du développement d'un follicule possédant un ovocyte non fonctionnel (Hsueh et al., 2015). Le dialogue ovocyte-granulosa et granulosa-granulosa par l'échange de molécules au travers des jonctions communicantes (*gap junctions*) est donc essentiel à la croissance des follicules pré-antraux. Puisque la zone pellucide apparaît à cette étape, les CGs entourant l'ovocyte maintiennent le contact avec ce dernier grâce à des extensions cytoplasmiques spécialisées communément appelées projections transzonales. Chez les souris déficientes en connexine 37, un constituant important des jonctions communicantes entre ces deux types cellulaires, la folliculogénèse s'interrompt précocement au stade secondaire (Carabatsos, Sellitto, Goodenough et Albertini, 2000). La déficience en connexine 43, présente uniquement dans les jonctions communicantes inter-granulosas, empêche la croissance folliculaire au-delà du stade primaire (Ackert, Gittens, O'Brien, Eppig et Kidder, 2001).

Deux facteurs de croissance de la famille des TGF- $\beta$ , le BMP-15 et le GDF9, sont exprimés spécifiquement dans l'ovocyte (Dube et al., 1998; McGrath, Esquela et Lee, 1995). BMP-15 est essentiel au développement folliculaire chez la brebis (Galloway et al., 2000; Hanrahan et al., 2004), la vache (Juengel et al., 2009) et la femme (Di Pasquale, Beck-Peccoz et Persani, 2004; Dixit et al., 2006). Toutefois, son rôle semble limité chez la souris (Yan et al., 2001). Il a été suggéré que la dépendance envers BMP-15 serait un élément clé différenciant les espèces mono- et poly-ovulatoires (Crawford et McNatty, 2012).

GDF9 est essentiel pour le développement folliculaire murin. Il est nécessaire à la prolifération des CGs (Elvin, Yan, Wang, Nishimori et Matzuk, 1999). Pour cette raison, les follicules de souris déficientes en GDF9 ne parviennent pas à se développer au-delà du stade primaire (Dong et al., 1996). GDF9 est aussi impliqué dans le recrutement des cellules précurseurs de la thèque (Elvin et al., 1999). Il a été démontré que GDF9 stimule la production d'IHH et de DHH, deux ligands de la voie Hedgehog qui sont déterminants pour la formation de la thèque et qui sont produits par les CGs (Liu, Peng, Matzuk et Yao, 2015). La vascularisation de la thèque est indispensable pour fournir plusieurs facteurs de croissance à la couche avasculaire de CGs.

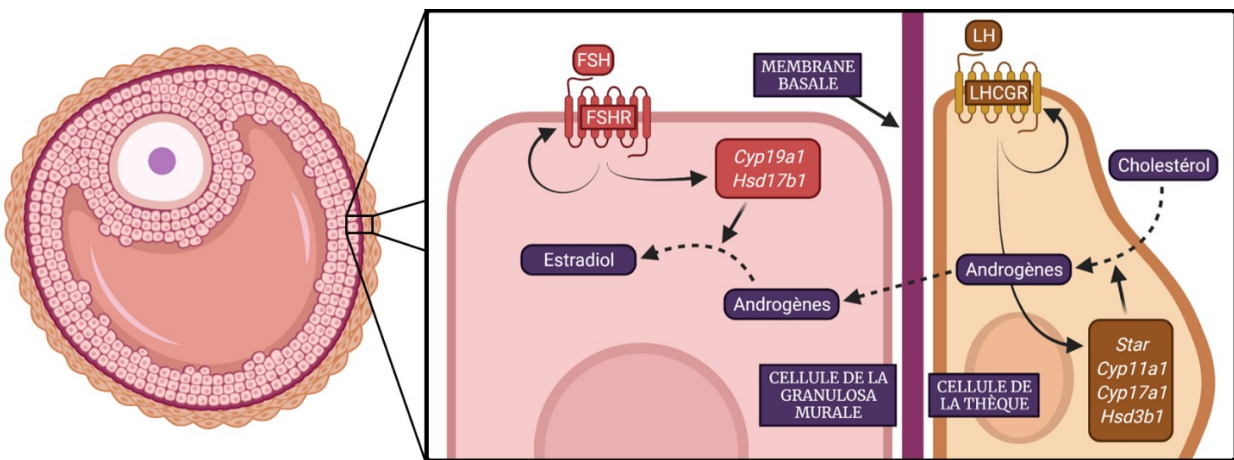
L'ovocyte sécrète la protéine RSPO2 à partir du stade primaire (Cheng et al., 2013). Lorsqu'ajouté à des ovaires immatures en culture, RSPO2 stimule la croissance des follicules primaires par un mécanisme dépendant de la voie Wnt (Cheng et al., 2013). L'activine A et le TGF- $\beta$  sont des facteurs qui originent des CGs et qui sont impliqués dans le développement des follicules pré-antraux (Oktem et Urman, 2010).

### 1.3.2.3 Croissance folliculaire antrale

Le développement folliculaire au-delà du stade secondaire requiert la stimulation par les gonadotrophines. À ce stade, la folliculogénèse passe d'une régulation qui était principalement intra-folliculaire (stades primordiaux à secondaire) à une régulation dépendante de l'axe gonadotrope (stade antral et pré-ovulatoire) (Kawashima et Kawamura, 2018; Orisaka et al., 2021). À cette étape, plusieurs follicules sont éliminés par atresie, un processus apoptotique, afin que seuls les follicules les plus sains atteignent le stade pré-ovulatoire (Johnson, 2003). Durant cette transition, l'antra folliculaire se forme par l'action d'aquaporines, des transporteurs de liquide exprimés dans les CGs (McConnell et al., 2002; West-Farrell et al., 2009). Combinée à l'action du GDF9 et BMP-15 produits par l'ovocyte, la formation de cet antra contribue à la différenciation des deux sous-populations de CGs, les cellules du cumulus (entourant l'ovocyte) et les CGs murales (accolées à la paroi interne du follicule) (Robker, Hennebold et Russell, 2018). L'ovocyte stoppe sa croissance au stade antral (Combelles, Carabatsos, Kumar, Matzuk et Albertini, 2004). Le complexe cumulus-ovocyte sera discuté plus en détail dans la section sur l'ovulation. Durant la phase de croissance dépendante des gonadotrophines, les CGs murales sont impliquées dans la stéroïdogénèse et subissent une prolifération importante.

La stéroïdogénèse folliculaire débute par la liaison de la LH sur son récepteur (LHCGR) exprimé à la surface des cellules de la thèque (Figure 9). En plus d'induire l'expression de son récepteur, la LH induit l'expression de *Star* (le gène codant pour la protéine de transport du cholestérol dans la membrane interne de la mitochondrie) et de plusieurs enzymes nécessaires à la conversion du cholestérol en androgènes (Cyp11a1, Cyp17a1, Hsd3b1) (Magoffin, 2005; Richards, Ren, Candelaria, Adams et Rajkovic, 2018). Les androgènes produits par la thèque diffusent à travers la membrane basale du follicule (Figure 9). Ils augmentent l'expression du récepteur à la FSH en se liant à des récepteurs aux androgènes dans les CGs (Fujibe et al., 2019;

Sen et al., 2014). Pour ces raisons, les cellules de la thèque ont un rôle important dans l'acquisition de la dépendance des follicules à la FSH (Orisaka et al., 2021). Les androgènes sont convertis en estradiol (l'estrogène le plus puissant) par l'aromatase (aussi CYP19A1) et la 17 $\beta$ -HSD-1 (Stocco et al., 2007). L'expression de ces enzymes dans les CGs murales est régulée par la liaison de la FSH sur son récepteur (Figure 9) (Farookhi et Desjardins, 1986; Magoffin, 2005). L'estradiol est important pour la survie folliculaire, car il induit l'expression des récepteurs à la FSH et à la LH et de l'aromatase et limite l'apoptose et favorise la prolifération des CGs (Pangas et Rajkovic, 2014).



**Figure 9.** – Coordination thèque-granulosa durant la stéroïdogénèse folliculaire

La stéroïdogénèse folliculaire débute par la liaison de la LH à la surface des cellules de la thèque (brune, à droite), ce qui stimule l'expression de plusieurs effecteurs impliqués dans la biosynthèse d'androgènes à partir du cholestérol (*Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1* et *Hsd3b1*). Les androgènes ainsi produits diffusent à travers la membrane basale folliculaire (violet) où ils sont ensuite convertis en estradiol dans les cellules de la granulosa murales (rose, au centre). La FSH est nécessaire à l'induction des enzymes impliquées dans cette conversion des androgènes en estradiol (*Cyp19a1* et *Hsd17b1*).

La FSH est le principal régulateur de la croissance folliculaire à partir du stade antral en favorisant la prolifération et en empêchant l'apoptose des CGs (Chun et al., 1996; Hsueh, Billig et Tsafiri, 1994). La délétion génique de la sous-unité  $\beta$  spécifique à la FSH ou de FSHR interrompt la croissance folliculaire antrale (Dierich et al., 1998; Kumar, Wang, Lu et Matzuk, 1997). La plupart des actions de la FSH s'effectuent par l'activation de la PKA suivant l'augmentation des



niveaux en AMPc (Hunzicker-Dunn et Mayo, 2014). La FSH active aussi la voie de signalisation PI3K/AKT, ce qui contribue à l'expression de marqueurs de différenciation des CGs tels que *Cyp19a1*, *Hsd3b1*, *Inha* et *Lhcgr* (Hunzicker-Dunn et Mayo, 2014).

La FSH et l'estradiol sont tous les deux impliqués dans l'augmentation de l'expression de *Ccnd2*, un gène clé dans l'entrée des CGs dans le cycle cellulaire (Robker et Richards, 1998). Les souris déficientes en *Ccnd2* sont infertiles et leurs follicules ne possèdent que quelques couches de CGs (Sicinski et al., 1996). La FSH augmente la production de *Nppc* par les CGs (Sato, Cheng, Kawamura, Takae et Hsueh, 2012). Une fois clivé, le NPPC devient le *C-type Natriuretic Peptide* (CNP) et stimule la production de GMPc. En plus de prévenir la reprise prématurée de la méiose ovocytaire, de hauts niveaux de GMPc stimulent la prolifération des CGs du stade pré-antral (Sato et al., 2012).

En présence de FSH, les CGs expriment plusieurs facteurs anti-apoptotiques tels que le XIAP, le CFLAR (aussi FLIP) et BCL2 (Jiang, Cheung, Wang et Tsang, 2003; Johnson, 2003). Toutefois, en absence de stimulation, les CGs expriment BAX, le ligand Fas (FASL) et son récepteur FAS, des effecteurs impliqués dans l'apoptose cellulaire et l'atrésie folliculaire (Jiang et al., 2003; Johnson, 2003). Le processus d'apoptose conduit à la fragmentation du noyau et à la dégradation de l'ADN et est médié par des caspases (Johnson, 2003).

En réponse à l'hypoxie folliculaire causée par une importante prolifération des CGs, plusieurs facteurs pro-angiogéniques sont libérés. Il est admis que le VEGFA, le facteur angiogénique le plus puissant, favorise le développement folliculaire en modulant la quantité de gonadotrophines pouvant atteindre le follicule (Rimon-Dahari et al., 2016). À cet égard, la neutralisation de son récepteur (KDR, aussi VEGFR2) entraîne une diminution importante du développement folliculaire au stade antral (Zimmermann et al., 2003).

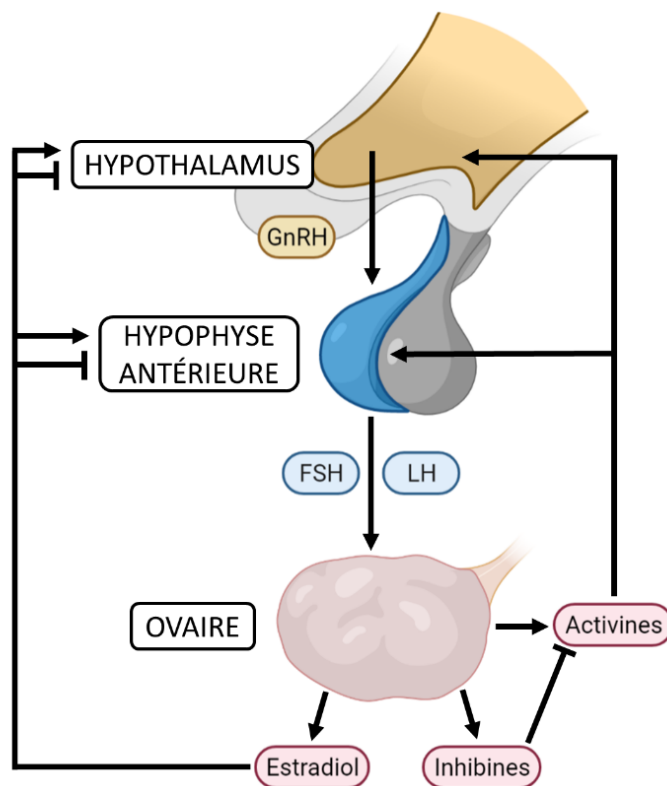
En plus de son action inhibitrice sur le recrutement folliculaire, l'AMH agit sur la folliculogénèse en diminuant la sensibilité des CGs à la FSH (Durlinger et al., 2001). Il a été suggéré que l'AMH permettrait ainsi d'éviter qu'un trop grand nombre de follicules atteigne le stade antral dans la même vague folliculaire (Visser et Themmen, 2005). Les CGs des follicules en croissance sécrètent aussi des activines et des inhibines, des protéines membres de la famille des TGF- $\beta$  qui

sont impliquées dans la régulation des gonadotrophines (Gregory et Kaiser, 2004). Les activines stimulent la relâche de GnRH par les neurones hypothalamiques et peuvent aussi augmenter directement la synthèse de FSH par les cellules gonadotropes (Figure 10) (Attardi et Miklos, 1990; Calogero, Burrello, Ossino, Polosa et D'Agata, 1998). Les inhibines antagonisent l'action des activines (Figure 10) ce qui résulte en un effet net de suppression de la sécrétion de FSH (Gregory et Kaiser, 2004).

Par un mécanisme encore imparfaitement détaillé, de faibles doses d'estradiol effectuent un rétrocontrôle négatif de la sécrétion de la FSH par les cellules gonadotropes de l'hypophyse (Figure 10) (Herbison, 2014). Ce mécanisme de régulation entraîne l'atrésie des follicules n'exprimant pas des niveaux suffisamment élevés de FSHR pour permettre leur survie. Au contraire, lorsque les follicules pré-ovulatoires produisent de hauts niveaux d'estradiol, un rétrocontrôle positif de sécrétion de la GnRH s'enclenche (Figure 10), conduit à l'accélération de la sécrétion pulsatile de GnRH et à la relâche massive de LH dans la circulation sanguine. Tandis que les petits follicules antraux ne possèdent des récepteurs à la LH que dans la thèque, les follicules pré-ovulatoires les expriment aussi dans les CGs. Il s'agit d'un élément clé qui leur permettra d'ovuler en réponse à une augmentation de la concentration sanguine en LH (Rimon-Dahari et al., 2016).

### 1.3.3 Ovulation

Pour certains auteurs, le terme « ovulation » désigne uniquement le processus par lequel le follicule se rompt pour libérer l'ovocyte. Dans cette thèse, l'ovulation désigne tous les processus ovariens secondaires à l'activation du récepteur à la LH qui surviennent dans un follicule pré-ovulatoire. Cela comprend la reprise de la méiose ovocytaire, l'expansion du cumulus, la rupture du follicule, ainsi que la lutéinisation des CGs murales et de la thèque (Figure 11). Pour cette raison, le pic de LH (*LH peak*) qui survient durant l'ovulation est une étape charnière pour le destin de plusieurs types cellulaires de l'ovaire.



**Figure 10.** – Régulation de l'axe gonadotrope

La sécrétion de GnRH par l'hypothalamus (jaune) est le principal régulateur de la synthèse et de la libération des gonadotrophines par l'hypophyse antérieure (bleue). Durant la croissance folliculaire antrale, en réponse à la stimulation par les gonadotrophines, l'ovaire produit plusieurs molécules ayant pour effet de moduler l'axe gonadotrope. Les activines stimulent la relâche de GnRH par les neurones hypothalamiques et augmentent la synthèse de FSH par les cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure. Les inhibines limitent la sécrétion de FSH en antagonisant l'action des activines. De faibles doses d'estradiol effectuent un rétrocontrôle négatif sur l'axe gonadotrope. Au contraire, de hauts niveaux d'estradiol entraînent un rétrocontrôle positif de la sécrétion pulsatile de GnRH. Ce phénomène est à l'origine du pic de sécrétion de la LH qui initie l'ovulation durant l'estrus.

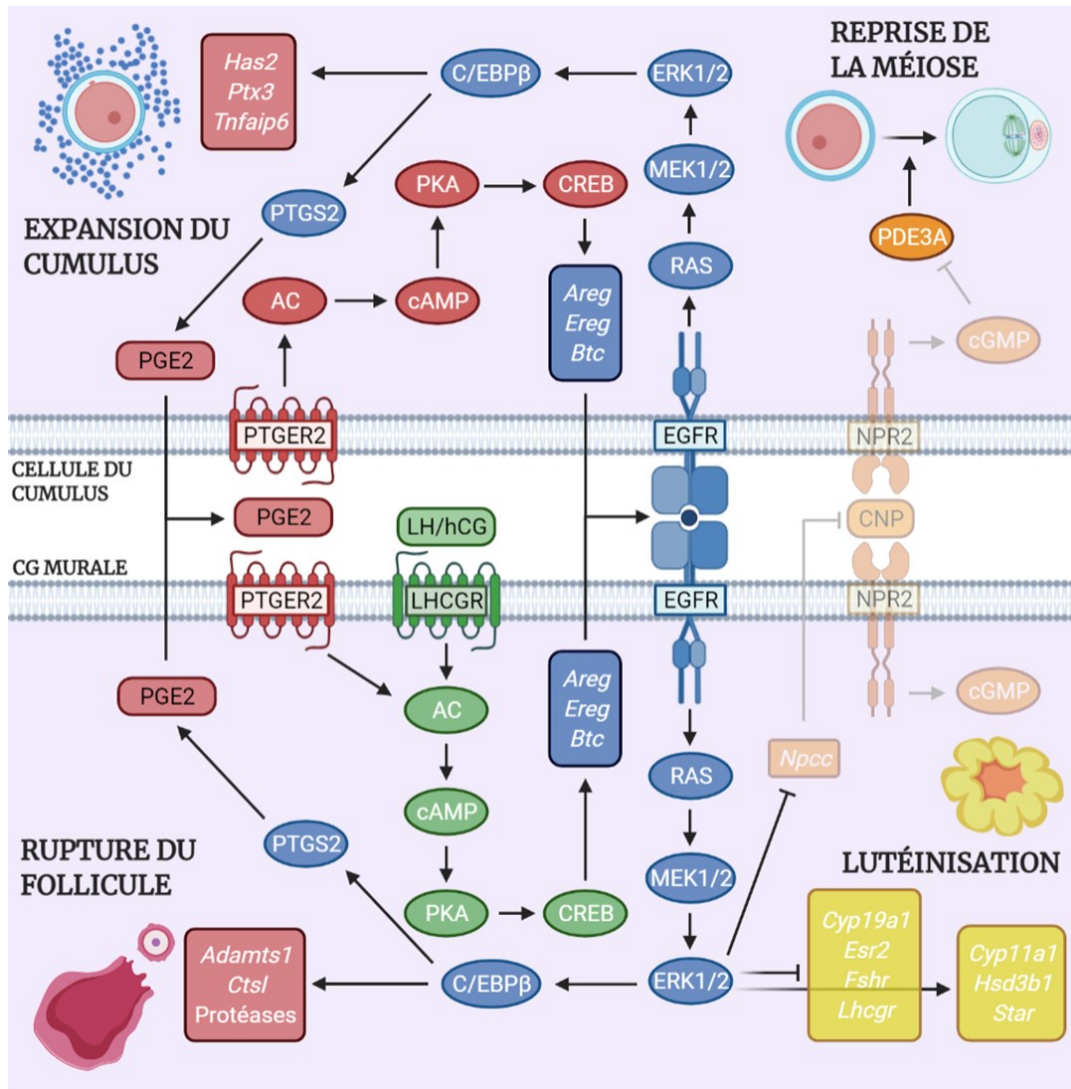
Les défauts d'ovulation sont responsables d'environ 30% des cas d'infertilité humaine (Hamilton-Fairley et Taylor, 2003). Bien que plusieurs défauts hypophysaires ou ovariens peuvent être en cause, le syndrome des ovaires polykystiques représente la forte majorité des cas d'anovulation (Balen, 2014). Une meilleure caractérisation des mécanismes impliqués dans la transmission du signal de LH dans l'ovaire serait favorable à notre compréhension de ce

syndrome. De plus, l'étude des causes ovariennes d'anovulation serait bénéfique pour le développement de nouvelles molécules anovulantes dans le domaine de la contraception.

### 1.3.3.1 Signalisation LH

La liaison de la LH sur son récepteur couplé aux protéines G présent à la surface des CGS murales entraîne une cascade de signalisation complexe qui implique plusieurs effecteurs intracellulaires (Figure 11). La majorité des effets de la LH sont médiés par l'activation de la sous-unité  $G\alpha_s$  qui recrute l'adénylate cyclase et induit une augmentation intracellulaire des niveaux d'AMPc (Chin et Abayasekara, 2004; Salvador et al., 2002). Par son effet similaire sur l'AMPc, la forskoline (FSK) est fréquemment utilisée in vitro pour reproduire une stimulation à la LH. Par la suite, l'activation de la protéine kinase A (PKA) entraîne la phosphorylation activatrice du facteur de transcription CREB (Mukherjee, Park-Sarge et Mayo, 1996).

Par un mécanisme impliquant l'action de la PKA, la LH stimule l'expression génique et le clivage par des métalloprotéases de facteurs de croissance structurellement similaires à l'EGF (*EGF-like*) présents à la membrane cellulaire (Hsieh et Conti, 2005; Panigone, Hsieh, Fu, Persani et Conti, 2008). AREG, EREG et BTC sont ainsi libérés dans le liquide folliculaire et agissent comme médiateurs clés dans la transmission paracrine du signal LH dans le follicule par l'activation de leur récepteur de la famille des récepteurs à l'EGF (EGFR) (Figure 11) (Park et al., 2004). Bien que n'exprimant pas LHCGR (Peng, Hsueh, LaPolt, Bjersing et Ny, 1991; Richards et Ascoli, 2018), les cellules du cumulus répondent au signal ovulatoire en partie par ce mécanisme. En ce sens, la perte d'*Areg* ou d'*Ereg* entraîne une réponse diminuée des cellules du cumulus et de l'ovocyte au signal ovulatoire (Hsieh et al., 2007). L'activation de LHCGR conduit à la phosphorylation activatrice des kinases ERK1/2 par un mécanisme dépendant en partie de l'activation d'EGFR (Figure 11) (Richards et Ascoli, 2018). L'inhibition génique ou pharmacologique d'*Erk1/2* dans l'ovaire murin entraîne des défauts importants dans tous les processus ovulatoires et de l'infertilité (Fan et al., 2009; Siddappa et al., 2015). L'activation de la voie de signalisation ERK1/2 est essentielle à l'ovulation en entraînant l'expression ou l'activation de plusieurs de ses effecteurs clés tels que *Adamts1*, *Cebpb*, *Has2*, *Pgr*, *Ptgs2*, *Ptx3* et *Tnfaip6* (Fan et al., 2009; Siddappa et al., 2015). Leurs rôles spécifiques sont discutés dans les sections suivantes.



**Figure 11.** – Cascade de signalisation de la LH dans les cellules de la granulosa

La cascade de signalisation de la LH dans les follicules pré-ovulatoires est responsable de l'activation de plusieurs effecteurs intracellulaires impliqués dans l'ovulation. Au cœur de la cascade (en vert, au centre), la liaison de la LH sur son récepteur entraîne l'activation de la voie PKA-CREB. Cette dernière est responsable de l'induction des facteurs de croissance épidermiques (*Areg*, *Ereg*, *Btc*) et de l'activation autocrine et paracrine subséquente de la voie EGFR-ERK1/2 (en bleu, au centre). Cette voie est à l'origine de la régulation des effecteurs impliqués dans la reprise de la méiose ovocytaire (orange, en haut à droite), dans la lutéinisation (jaune, en bas à droite), ainsi que dans la rupture du follicule (rouge, en bas à gauche) et dans l'expansion du cumulus (rouge, en haut à gauche). Par l'activation de la voie PKA-CREB (en rouge), la liaison de PGE2 sur son récepteur contribue aux deux derniers processus. Les effecteurs en transparence sont plus fortement exprimés avant l'ovulation.

### 1.3.3.2 Reprise de la méiose

Dans le follicule en croissance, le développement ovocytaire est arrêté au stade de la prophase I. Cet arrêt est maintenu grâce à la communication de l'ovocyte avec les CGs du cumulus et murales au moyen de jonctions communicantes (Gilula, Epstein et Beers, 1978). Avant l'ovulation, les CGs murales expriment de hauts niveaux de *Nppc*, menant à la production du ligand CNP. Ce ligand active en permanence les récepteurs NPR2 présents à la surface des CGs murales et du cumulus (Zhang, Su, Sugiura, Xia et Eppig, 2010). NPR2 est un récepteur à la guanylate cyclase, son activation contribue à de hauts niveaux intracellulaires de GMPc dans les CGs, mais aussi dans l'ovocyte par sa diffusion passive à travers les jonctions communicantes. Le GMPc a un effet inhibiteur sur l'activité de la phosphodiesterase PDE3A, une enzyme impliquée dans la dégradation de l'AMPc dans l'ovocyte (Norris et al., 2009). La concentration élevée en AMPc intra-ovocytaire maintient l'ovocyte en arrêt méiotique.

En réponse au signal ovulatoire, l'expression de *Nppc* et l'activité de NPR2 diminuent dans les CGs (Figure 11) (Kawamura et al., 2011; Robinson et al., 2012). La diminution des niveaux de GMPc dans les trois types cellulaires impliqués entraîne une augmentation de l'activité de la PDE3A dans l'ovocyte (Figure 11) (Richards et Ascoli, 2018). Il s'ensuit une diminution drastique des niveaux intra-ovocytaires d'AMPc qui constitue le signal clé pour la reprise de la méiose. En effet, l'ajout d'AMPc (Cho, Stern et Biggers, 1974) ou l'inhibition constante de PDE3A (Magnusson et Hillensjö, 1977) résulte en un arrêt permanent de la méiose. Le MPF est un complexe protéique comprenant la kinase CDK1 qui est activé par la baisse en AMPc et qui permet la reprise de la méiose (Adhikari et Liu, 2014). L'ovocyte subit ensuite une dissolution de son enveloppe nucléaire (couramment désignée *germinal vesicle breakdown - GVBD*), une condensation de sa chromatine et formera un globule polaire (*polar body*). Cette maturation nucléaire jusqu'au stade de la métaphase II, combinée à des modifications cytoplasmiques, prépare l'ovocyte en vue d'une potentielle fécondation par le spermatozoïde.

### 1.3.3.3 Expansion du cumulus

En réponse au signal ovulatoire, la production d'une matrice extracellulaire de protéoglycanes riche en acide hyaluronique par les cellules du cumulus entraîne leur dispersion

excentrique, ainsi que leur dissociation des CGs murales et de l'ovocyte. Lorsque l'expansion du cumulus est complétée, les spermatozoïdes ont un accès facilité à la membrane ovocytaire.

En absence de LHCGR à la surface des cellules du cumulus, c'est l'activation de EGFR par l'AREG, l'EREG et le BTC produits par les CGs murales qui amorce ce processus (Figure 11) (Park et al., 2004). L'activation subséquente de ERK1/2 intervient dans ce processus, notamment par l'induction de la *Ptgs2* (Fan et al., 2009), nécessaire à la production de prostaglandines et à l'activation de leur récepteur (PTGER2) à la surface des cellules du cumulus (Figure 11). Les souris déficientes en *Ptgs2* n'ont pas d'expansion du cumulus, mais ce défaut est complètement restauré par l'ajout de prostaglandine E2 (PGE2) (Davis et al., 1999). La liaison de PGE2 sur PTGER2 induit l'expression de *Has2* (*hyaluronan synthase 2*), *Tnfaip6* (*tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced protein 6*) et *Ptx3* (*pentraxin 3*) (Liu, Fan, Wang et Richards, 2010), trois gènes impliqués dans la production et la stabilisation de la matrice d'acide hyaluronique (Figure 11).

Le versican est un agent de réticulation (*cross-linker*) de la matrice d'hyaluronane qui est principalement produit par les CGs murales en période péri-ovulatoire (Russell, Ochsner, Hsieh, Mulders et Richards, 2003). ADAMTS1 est une métalloprotéase produite par les CGs murales en réponse au signal ovulatoire (Robker et al., 2000). Elle contribue à l'expansion du cumulus en coupant le versican dans la matrice extracellulaire (Russell, Doyle, Ochsner, Sandy et Richards, 2003). Le versican est aussi impliqué dans l'expression de *Has2*, *Ptgs2* et *Tnfaip6* par les cellules du cumulus par son activation directe du récepteur à l'EGF (Dunning et al., 2015).

#### 1.3.3.4 Rupture du follicule

La rupture du follicule ovulatoire est un processus hautement inflammatoire qui implique la synthèse de plusieurs protéases, la sécrétion de cytokines, le remodelage vasculaire, la contraction des cellules musculaires lisses et l'infiltration leucocytaire afin d'amincir et de perforer la paroi folliculaire à son apex (Duffy, Ko, Jo, Brannstrom et Curry, 2018). Ce phénomène entraîne l'expulsion du COC dans la bourse ovarienne, un processus qui survient environ 12 à 14 heures après le signal ovulatoire chez la souris (Miller et Takahashi, 2013).

Il est admis que la majorité des effets de la stimulation du LHCGR implique l'activation de la protéine  $G\alpha_s$  et la production d'AMPC. Toutefois, il a été démontré que l'activation de la

protéine  $G\alpha_{q/11}$  et la production d' $IP_3$  subséquente jouent aussi un rôle dans le processus ovarien de rupture folliculaire par l'induction de *Pgr* (Breen et al., 2013). Le récepteur à la progestérone (PGR) est un récepteur nucléaire de la famille des facteurs de transcription qui, lorsqu'activé par la progestérone, transloque dans le noyau de la cellule et induit l'expression de plusieurs protéases (CTSL, ADAMTS-1, Figure 11) impliquées dans le remodelage de la paroi folliculaire durant l'ovulation (Brown et al., 2010; Robker et al., 2000). Son rôle est essentiel dans l'ovulation; les souris déficientes en *Pgr* sont infertiles et sont incapables de libérer les complexes cumulus-ovocyte (COCs) dans l'oviducte, même sous stimulation par des gonadotrophines (Lydon et al., 1995). Les COCs sont emprisonnés dans les follicules et aucun corps jaune n'est formé (Lydon et al., 1995).

Les prostaglandines sont fortement impliquées dans le processus inflammatoire de remodelage de la paroi folliculaire (Duffy et al., 2018). La PTGS2 est l'enzyme limitante dans la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines, son rôle dans la rupture folliculaire est donc bien décrit. De manière similaire aux souris déficientes en *Pgr*, l'absence de *Ptgs2* se solde par un nombre plus faible de COCs récupérés dans les oviductes en réponse à une stimulation aux gonadotrophines (Lim et al., 1997). Les souris sont sous-fertiles et leurs ovaires ne contiennent aucun corps jaune (Dinchuk et al., 1995). Les prostaglandines PGE2 et PGF2 $\alpha$  participent à la rupture folliculaire notamment par leur action sur les cellules musculaires lisses et leur rôle dans le remodelage vasculaire (Duffy et al., 2018). L'EDN2 est aussi un facteur important pour la contraction des cellules musculaires lisses nécessaire à la rupture du follicule (Cacioppo et al., 2017). L'enzyme PDE4D permet de dégrader l'AMPc en réponse au signal ovulatoire. L'induction de l'expression de PDE4D par la LH est impliquée dans la rupture folliculaire en permettant la régulation adéquate des niveaux d'AMPc et l'induction de *Pgr* et *Ptgs2* (Park et al., 2003).

#### 1.3.3.5 Lutéinisation

La lutéinisation est le processus de transformation des follicules pré-ovulatoires rupturés en corps jaunes, des structures endocrines transitoires spécialisées dans la production de progestérone. La lutéinisation des follicules implique l'hypertrophie et la différenciation finale des CGs murales et de la thèque en cellules lutéales, la néovascularisation et l'infiltration leucocytaire.



Au point de vue moléculaire, les cellules lutéales expriment un patron stéroïdogène différent de leurs cellules précurseurs. Le pic de LH induit la diminution des niveaux en ARN messagers de *Cy19a1*, *Esr2*, *Fshr* et *Lhcgr* et l'augmentation de *Cyp11a1*, *Hsd3b1* et *Star* (Figure 11) (Przygodzka, Plewes et Davis, 2021). Les cellules lutéales sont des cellules spécialisées dans l'entreposage du cholestérol et dans sa conversion en progestérone. STAR permet le transport du cholestérol de la membrane mitochondriale externe à la membrane mitochondriale interne où il est ensuite converti en prégnénolone par l'enzyme CYP11A1 (Rimon-Dahari et al., 2016). La prégnénolone sort ensuite de la mitochondrie et est convertie en progestérone par la 3 $\beta$ -HSD dans le réticulum endoplasmique (Rimon-Dahari et al., 2016). Le corps jaune produit aussi de faibles quantités d'estradiol (Stocco et al., 2007). L'estradiol et la progestérone permettent la préparation de l'utérus à la nidation en stimulant la prolifération et la différenciation des cellules endométriales (Kawashima et Kawamura, 2018).

Lors de leur différenciation en cellules lutéales, les CGs perdent leurs capacités prolifératives. En réponse au signal ovulatoire, l'expression de *Ccnd2* diminue et l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire *Cdkn1a* et *1b* augmente (Robker et Richards, 1998). Quant à elles, les cellules endothéliales prolifèrent et participent à la néovascularisation massive (Przygodzka et al., 2021). Cette étape est nécessaire afin de maximiser la production de progestérone. La rupture des follicules entraîne la destruction de la membrane basale et permet ainsi aux vaisseaux sanguins (précédemment confinés à la thèque) d'envahir toute la carcasse folliculaire. VEGFA est un acteur important dans la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Rimon-Dahari et al., 2016). Son inhibition pharmacologique durant l'ovulation mène à la formation de petits corps jaunes avasculaires (Ferrara et al., 1998). HIF-1 $\alpha$  est considéré comme le facteur de transcription le plus important pour l'expression de VEGFA (Lu, Li, Wang et Zhang, 2019).

L'inhibition génique des facteurs de transcription C/EBP $\alpha$  et  $\beta$  empêche la lutéinisation adéquate et entraîne des défauts d'expression de plusieurs gènes impliqués dans la néovascularisation et la fonction endothéliale (Fan, Liu, Johnson et Richards, 2011). Les cellules lutéales expriment le récepteur à la prolactine qui est nécessaire pour leur survie, la stéroïdogénèse et l'angiogénèse (Grosdemouge et al., 2003).

#### 1.3.4 Physiologie du corps jaune

Chez la souris, la production de progestérone par l'ovaire est essentielle pour le maintien de la gestation jusqu'à deux jours avant la parturition (Hilliard, 1973). La sécrétion de prolactine est importante pour le maintien de la fonction lutéale durant la gestation (Gibori et Richards, 1978; Zhong, Parmer, Robertson et Gibori, 1997). Une diminution de la sécrétion de progestérone est toutefois nécessaire pour la parturition (Stocco et al., 2007). La régression des corps jaunes (lutéolyse) et la diminution de leur sécrétion de progestérone sont dépendantes de la prostaglandine PGF2 $\alpha$  produite par l'endomètre (Stocco et al., 2007). PGF2 $\alpha$  stimule l'expression de l'enzyme 20 $\alpha$ -HSD qui convertit la progestérone en un métabolite peu actif, la 20 $\alpha$ -OH-progestérone (Stocco et al., 2000). Les cellules lutéales et endothéliales entrent en apoptose durant la lutéolyse et sont remplacées par du tissu conjonctif fibreux pour former une structure ovarienne inactive, le corps blanc (*corpus albicans*) (Stocco et al., 2007).

Lors d'un cycle estral sans copulation, les corps jaunes régressent en quelques jours (Bertolin et Murphy, 2014). La lutéolyse est nécessaire pour l'ovulation des follicules du cycle estral suivant, car de hauts niveaux de progestérone inhibent la sécrétion de LH (Bertolin et Murphy, 2014).

## 2. Voie de signalisation Hippo

Les premières avancées dans la caractérisation de la voie de signalisation Hippo sont survenues au milieu des années 90 dans l'étude de potentiels gènes suppresseurs de tumeur chez la drosophile (Justice, Zilian, Woods, Noll et Bryant, 1995; Xu, Wang, Zhang, Stewart et Yu, 1995). La mutation de certains de ses effecteurs engendre de la surprolifération tissulaire et des replis épithéliaux. C'est l'apparence phénotypique grossière des drosophiles mutantes ressemblant à celle d'un hippopotame qui a inspiré le nom « Hippo » à la voie. Il s'agit d'une voie de signalisation conservée durant l'évolution et qui est importante dans la régulation de plusieurs processus cellulaires chez le mammifère. À la suite des premières avancées dans la description de ses effecteurs et de ses fonctions, la voie Hippo a été amplement étudiée dans l'organogenèse et dans l'oncogenèse. Cette section présente les effecteurs principaux de la voie Hippo, ses rôles

biologiques les mieux décrits, les acteurs impliqués dans sa régulation ainsi que les stratégies pharmacologiques de modulation de son activité.

## **2.1 Cascade de signalisation**

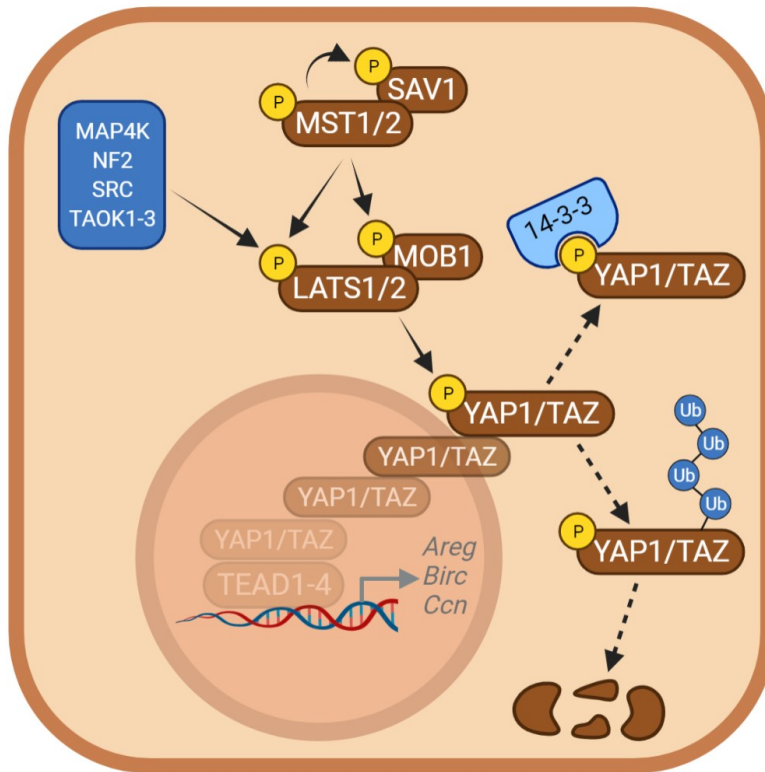
Le cœur de la voie de signalisation Hippo consiste en une cascade de kinases qui, lorsqu'activée, conduit ultimement à la phosphorylation des co-régulateurs transcriptionnels YAP1 et TAZ (YAP1/TAZ à partir de maintenant) (Figure 12). Lorsque la voie Hippo est inactive, YAP1/TAZ sont en mesure de se lier à des facteurs de transcription présents dans le noyau de la cellule et de réguler l'expression génique. Les principaux constituants de la voie sont présentés ici dans l'ordre pour lequel ils interviennent dans la cascade de signalisation Hippo.

### **2.1.1 Kinases MST**

Les kinases MST1 et MST2 (MST1/2 à partir de maintenant) sont les premières kinases impliquées dans l'activation de la voie Hippo. En réponse à un signal activateur de la voie, elles s'hétéro-dimérisent avec la sous-unité régulatrice SAV1 et la phosphorylent (Figure 12). SAV1 contribue au maintien de l'activation de MST1/2 en inhibant l'activité de STRIPAK (Bae et al., 2017; Zheng et al., 2017), un complexe de protéines impliqué dans la déphosphorylation de MST1/2 (Ma, Meng, Chen et Guan, 2019). L'autophosphorylation joue aussi un rôle important dans l'activation des kinases MST (Glantschnig, Rodan et Reszka, 2002). Au final, l'activation de MST1/2 entraîne la phosphorylation en aval des kinases LATS1 et LATS2 (LATS1/2 à partir de maintenant) (Figure 12) (Chan et al., 2005).

### **2.1.2 Kinases LATS**

En plus de MST1/2, les kinases de la famille MAP4K, le NF2, le SRC et les kinases TAO (TAOK) peuvent moduler l'activation de LATS1/2 (Figure 12) (Meng et al., 2015; Plouffe et al., 2016; Si et al., 2017; Yin et al., 2013). MOB1A et 1B sont des partenaires de liaison de LATS1/2 qui contribuent à l'activation de ces dernières (Hergovich, Schmitz et Hemmings, 2006; Lai et al., 2005). Ils sont aussi phosphorylés par MST1/2 (Praskova, Xia et Avruch, 2008). Dans certains contextes cellulaires, l'ubiquitination est impliquée dans la régulation de l'activité de LATS1/2 (Meng, Moroishi et Guan, 2016).



**Figure 12.** – Activation de la voie de signalisation Hippo

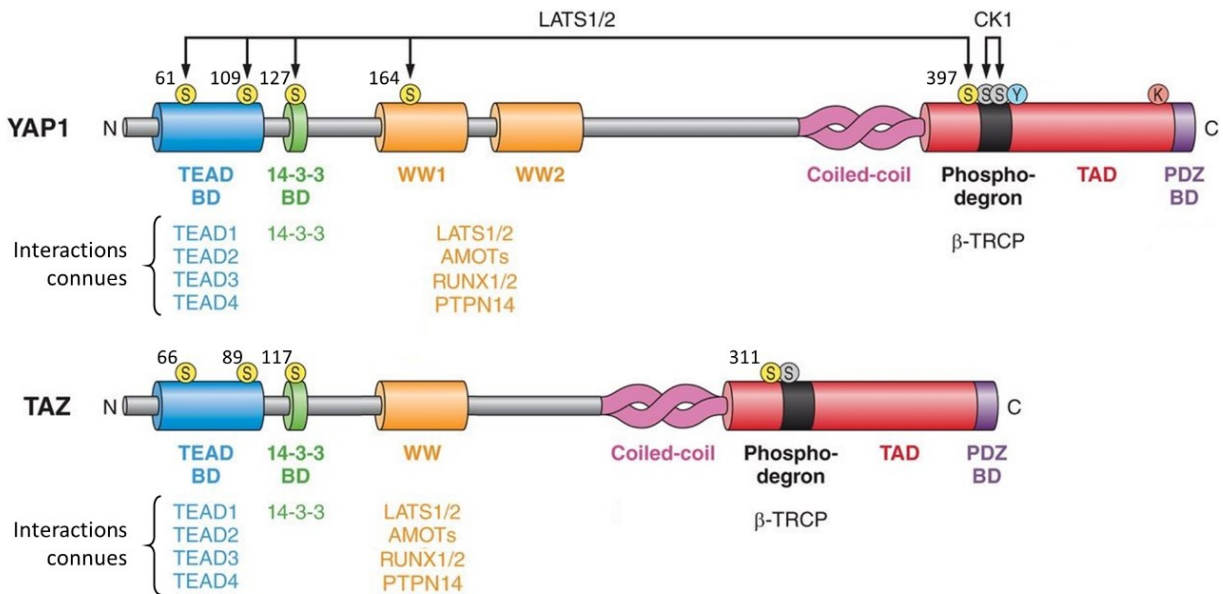
L'activation de la voie de signalisation Hippo résulte ultimement en la phosphorylation des effecteurs YAP1 et TAZ par une cascade impliquant la phosphorylation activatrice des kinases MST1/2 et LATS1/2. Plusieurs autres kinases (en bleu) agissent en aval de cette cascade. La phosphorylation de YAP1 et de TAZ empêche leur interaction avec des facteurs de transcription dans le noyau de la cellule et prévient ainsi l'induction de l'expression des gènes cibles de la voie. Leur phosphorylation favorise leur séquestration cytoplasmique par les protéines 14-3-3, ainsi que leur dégradation secondaire à leur poly-ubiquitination. Les effecteurs bruns sont les effecteurs classiques de la voie. Les effecteurs en transparence sont plus fortement exprimés lorsque la voie Hippo est inactive.

### 2.1.3 Coactivateurs transcriptionnels YAP1 et TAZ.

La fonction principale de la cascade de signalisation Hippo est la régulation des deux co-régulateurs de transcription de la voie; YAP1 (aussi simplement YAP) et TAZ (aussi WWTR1). Dépendamment du contexte cellulaire, YAP1/TAZ peuvent avoir des fonctions complètement distinctes ou être fonctionnellement redondants (i.e. la perte d'un des deux effecteurs peut être entièrement compensée par la présence de l'autre) (Reggiani, Gobbi, Ciarrocchi et Sancisi, 2021).

### 2.1.3.1 Structure

YAP1/TAZ présentent une séquence en acides aminés homologue à 46% et possèdent plusieurs domaines d'interactions communs (Hong et Guan, 2012). Les domaines de liaison aux facteurs de transcription et aux protéines de la famille 14-3-3 sont situés en extrémité N-terminale (Figure 13). L'interaction entre YAP1/TAZ et plusieurs protéines s'effectue grâce à un motif PPXY (proline-proline-acide aminé quelconque-tyrosine) présent dans un domaine d'interaction WW en portion centrale (Figure 13). C'est le cas des facteurs de transcription de la famille RUNX, de LATS1/2, des protéines de la famille AMOT et de PTPN14 (Kwon, Kim et Jho, 2021; Reggiani et al., 2021). YAP1/TAZ possèdent aussi un domaine transactivateur situé dans l'extrémité C-terminale (Figure 13) (Piccolo, Dupont et Cordenonsi, 2014).



**Figure 13.** – Structure primaire des protéines YAP1 et TAZ

Les domaines de liaison aux facteurs de transcription (TEAD BD, en bleu) et aux protéines de la famille 14-3-3 (14-3-3 BD, en vert), ainsi que les domaines d'interaction WW (orange) et transactivateur (TAD, en rouge) sont de la même couleur pour YAP1 et pour TAZ afin de souligner l'homologie entre les deux protéines. Les sites de phosphorylation par LATS1/2 sont inscrits au-dessus des protéines. Image adaptée à partir de la figure 1 dans (Piccolo et al., 2014).

### 2.1.3.2 Inhibition de leur activité et localisation intracellulaire

YAP1/TAZ ne possèdent pas d'activité transcriptionnelle intrinsèque; ils doivent donc lier des facteurs de transcription dans le noyau de la cellule pour moduler la transcription des gènes cibles de la voie Hippo. Leur phosphorylation par les kinases LATS1/2 est le principal moyen de contrôle de leur localisation intracellulaire et donc de leur activité. La phosphorylation de la sérine 127 (YAP1) et 89 (TAZ) conduit à la liaison des protéines 14-3-3 et à leur localisation exclusive au cytoplasme de la cellule (Figure 12) (Kanai et al., 2000; Zhao, Li, Tumaneng, Wang et Guan, 2010). Leur phosphorylation sur les sérines 397 (YAP1) et 311 (TAZ) localisées dans le domaine transactivateur (Figure 13), quant à elle, favorise leur poly-ubiquitination et leur dégradation (Figure 12) (Liu, Zha, et al., 2010; Zhao et al., 2010). Cela s'effectue par la phosphorylation additionnelle par CK1 qui engendre la formation d'un domaine de dégradation (phosphodégron) reconnu par la protéine  $\beta$ -TRCP et le complexe enzymatique SCF (Piccolo et al., 2014; Reggiani et al., 2021).

Bien que LATS1/2 sont les principaux régulateurs de YAP1/TAZ, d'autres protéines peuvent moduler leur activité. Il a été démontré que PRPF4B, CDK1, YES1, SRC et MAPK8 (aussi JNK) peuvent aussi phosphoryler YAP1/TAZ (Kodaka et Hata, 2015; Ma et al., 2019; Piccolo et al., 2014). La liaison d'AMOT ou de PTPN14 avec YAP1/TAZ favorise la rétention cytoplasmique de ces derniers et prévient leur translocation nucléaire (Kwon et al., 2021). Récemment, la phosphorylation de YAP1 sur la sérine 127 par NLK a été démontrée comme favorisant la localisation nucléaire de YAP1 en déstabilisant son interaction avec 14-3-3 (Hong et al., 2017; Moon et al., 2017). Il s'agit d'une exception au modèle classique de phosphorylation inactivatrice des effecteurs YAP1/TAZ. Kwon et al. présentent une revue récente détaillée de toutes les modifications post-transcriptionnelles de YAP1/TAZ rapportées jusqu'à présent (Kwon et al., 2021).

Une forme constitutivement active de YAP1 obtenue en changeant les cinq sérines phosphorylables par LATS1/2 en alanines, appelée YAP5SA, est couramment utilisée dans des expériences de biologie moléculaire afin d'étudier l'impact de l'activation soutenue de YAP1.

### 2.1.3.3 Liaison à des facteurs de transcription

Tel que mentionné précédemment, YAP1/TAZ doivent se lier à des facteurs de transcription afin de réguler l'expression génique (Figure 12). La famille de facteurs de transcription TEAD est de loin la mieux décrite dans la signalisation Hippo. Malgré la grande homologie entre les quatre gènes TEAD (TEAD1-4), ils sont tous exprimés selon un patron tissulaire et développemental spécifique (Holden et Cunningham, 2018). Ils possèdent un domaine TEA de liaison à l'ADN qui reconnaît la séquence consensus 5'-g/aCATTCCa/t-3' dans le génome (Pocaterra, Romani et Dupont, 2020). Ils n'ont pas d'activité transcriptionnelle intrinsèque et doivent donc interagir avec des co-régulateurs pour activer la transcription génique (Kwon et al., 2021). YAP1/TAZ sont les co-activateurs des TEAD les mieux décrits. Dans le noyau de la cellule, l'extrémité N-terminale de YAP1 ou de TAZ se lie à l'extrémité C-terminale de TEAD pour former un complexe YAP1-TEAD ou TAZ-TEAD (YAP1/TAZ-TEAD à partir de maintenant) (Pocaterra et al., 2020). Il a été démontré dans certains contextes cellulaires que la stabilité de l'interaction YAP1/TAZ-TEAD peut être modulée par le PFK1 ou le TFCP2 (Kwon et al., 2021).

Parmi les autres facteurs pouvant interagir avec les TEADs pour réguler l'expression génique, on retrouve les co-régulateurs AP-1, TCF4, PARP1, SRF, MEF2, MAX et ceux de la famille *vestigial-like* (VGLL1-4) (Lin, Park et Guan, 2017).

Bien que la plupart des études transcriptionnelles se soient consacrées à l'interaction YAP1/TAZ-TEAD, YAP1/TAZ peuvent interagir avec plusieurs autres facteurs de transcription tels que PPAR- $\gamma$  (Hong et al., 2005), TBX5 (Murakami, Nakagawa, Olson et Nakagawa, 2005; Rosenbluh et al., 2012), ainsi que ceux des familles RUNX (Passaniti, Brusgard, Qiao, Sudol et Finch-Edmondson, 2017) et p53 (Furth, Aylon et Oren, 2018; Raj et Bam, 2019).

### 2.1.4 Gènes cibles classiques

Plusieurs études ont effectué des analyses du transcriptome combinées à l'inhibition ou la surexpression de composants de la voie Hippo afin d'identifier ses cibles transcriptionnelles (Hao, Chun, Cheung, Rashidi et Yang, 2008; Lu et al., 2010; Ota et Sasaki, 2008; Zhao et al., 2007). Évidemment, ces cibles varient selon le type cellulaire utilisé pour l'analyse. Parmi les gènes cibles de la voie Hippo les plus fréquemment identifiés, on retrouve les membres de la famille CCN

(*Ccn1/2/3* – aussi *Cyr61*, *Ctgf* et *Nov*) (Figure 12) qui jouent un rôle important dans le remodelage de la matrice extracellulaire et dans la prolifération, la migration et la différenciation cellulaires (Barreto, Ray et Ag Edgar, 2016). L'amphiréguline a été démontrée comme une cible directe de YAP1 et de TAZ dans des cellules épithéliales mammaires et des kératinocytes, respectivement (Kim et al., 2020; Zhang et al., 2009), tandis que le récepteur à la tyrosine kinase *Axl* a été démontré comme médiateur direct de l'activité oncogénique de YAP1 dans les hépatocytes humains (Xu et al., 2011). Les membres de la famille BIRC (*Birc2/5/7*) impliqués dans l'apoptose cellulaire sont aussi des gènes cibles classiques de la voie Hippo (Dong et al., 2007; Rosenbluh et al., 2012). Les gènes *Ankrd1*, *Sox9* et *Itgb2* ont aussi été rapportés comme étant régulés par la voie Hippo (Kodaka et Hata, 2015; Mannaerts et al., 2015; Zhao et al., 2008).

Puisque la plupart de ces gènes ne sont pas spécifiques à la voie Hippo, la simple analyse de leur expression n'est généralement pas suffisante pour évaluer l'activité de la voie (Pocaterra et al., 2020). La localisation et l'état de phosphorylation de YAP1/TAZ sont des indicateurs supplémentaires à évaluer. Aussi, l'immunoprécipitation de la chromatine et les analyses de l'activité luciférase (*luciferase reporter gene assay*) permettent d'identifier les gènes pour lesquels l'expression dépend de la liaison directe d'un complexe YAP1/TAZ-TEAD dans leur promoteur.

## **2.2 Rôle biologique**

Les premières investigations de la voie Hippo ont permis de démontrer son implication dans l'arrêt de la croissance des tissus lorsque ces derniers atteignent leur taille finale. L'activation de la voie Hippo, par la translocation cytoplasmique des co-régulateurs YAP1/TAZ, entraîne l'arrêt de la transcription des gènes impliqués dans la prolifération (Ota et Sasaki, 2008; Zhao et al., 2007). L'implication de la voie Hippo dans la régulation de l'apoptose des tissus est aussi bien connue depuis plusieurs années (Hamaratoglu et al., 2006; Huang, Wu, Barrera, Matthews et Pan, 2005). Ces deux processus de régulation tissulaire (prolifération et apoptose) sont centraux dans l'organogenèse, l'oncogenèse et dans l'homéostasie tissulaire à l'âge adulte. Par son implication dans ces processus cellulaires courants, la voie Hippo a été démontrée comme étant impliquée dans la physiologie de la quasi-totalité des types cellulaires étudiés jusqu'à présent.



### 2.2.1 Dans l'organogenèse

L'organogenèse est la phase de développement des organes qui survient durant la vie embryonnaire. Les organes se forment à partir des trois feuilletts embryonnaires (l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme). Les cellules se différencient et se spécialisent durant cette période développementale pour générer les différents types cellulaires que constitue un organe dans sa structure définitive. L'implication des effecteurs de la voie Hippo dans l'organogenèse a été revue pour plusieurs organes tels que le cœur (Chen, Li, Luo et Hou, 2020), les vaisseaux lymphatiques (Cha, Moon et Kim, 2021), le système nerveux (Li, Li, Chen et Fang, 2021), le poumon (Xie, Wu, Deng, Huo et Cheng, 2018), la peau (Rognoni et Walko, 2019), la glande mammaire (Shi, Feng et Chen, 2015), le foie (Driskill et Pan, 2021), le pancréas (Wu et al., 2021) et les intestins (Yu, Meng, Plouffe et Guan, 2015).

Sans entrer dans les détails moléculaires de ses actions, son interaction avec plusieurs voies de signalisation développementales telles que BMP, Hedgehog, Notch ou Wnt définit l'identité cellulaire. La dérégulation de la voie Hippo à certains moments clés du développement de ces organes conduit à des défauts morphologiques graves, parfois non compatibles avec la vie (Fu, Plouffe et Guan, 2017; Wu et Guan, 2021).

### 2.2.2 Dans l'oncogenèse

Le cancer résulte d'une croissance cellulaire désordonnée et ininterrompue. En raison de modifications génétiques, les cellules cancéreuses acquièrent des caractéristiques physiologiques impropres au tissu duquel elles originent et qui contribuent à leur malignité. Une plus grande capacité de migration, d'invasion, de dégradation de la matrice extracellulaire ou de recrutement de la néovascularisation sont des caractéristiques fréquemment acquises (Morciano et al., 2021). De plus, les cellules cancéreuses sont insensibles aux signaux inhibiteurs des tissus environnants et acquièrent des mécanismes pour échapper à l'apoptose. Du fait des nombreux rôles de la voie Hippo dans ces processus cellulaires, la dérégulation de composants de la voie Hippo est impliquée dans plusieurs cancers (Yu, Zhao et Guan, 2015; Zanconato, Cordenonsi et Piccolo, 2016). La surexpression de YAP1/TAZ ou l'inhibition des kinases en amont sont souvent associées à un processus cancéreux (Mohajan et al., 2021; Zanconato et al., 2016). Toutefois, seulement une faible proportion de cancers sont causés par une mutation génétique d'un des composants

de la voie Hippo (Yu, Zhao, et al., 2015). En plus de conférer des caractéristiques tumorales aux cellules, l'expression élevée de YAP1/TAZ est associée à la résistance à la chimiothérapie dans certains cancers (Bae, Kim et Lee, 2016).

### 2.2.3 Dans l'homéostasie tissulaire

De manière cohérente avec ses rôles dans la prolifération tissulaire, l'inactivation de la voie Hippo dans plusieurs organes tels que le foie, le cœur et la peau à l'âge adulte entraîne de l'organomégalie dans plusieurs modèles murins (Yu, Zhao, et al., 2015). Au-delà de ses rôles dans la croissance tissulaire, la voie Hippo participe à la physiologie normale de plusieurs tissus. Par exemple, dans les os, elle est impliquée dans le remodelage osseux par la différenciation des ostéoclastes et des ostéoblastes (Yang et al., 2018). Dans le tissu adipeux, elle joue un rôle dans la prolifération et la différenciation des adipocytes (Ardestani, Lupse et Maedler, 2018). Tandis que dans les îlots pancréatiques, elle est impliquée dans la survie et la régénération des cellules  $\beta$  sécrétrices d'insuline (Ardestani et Maedler, 2017). Il a été démontré que la localisation nucléaire de YAP1 est impliquée dans le processus de régénération après un dommage hépatique ou intestinal (Cai et al., 2010; Grijalva et al., 2014). Aussi, la perte d'expression de YAP1/TAZ dans la couche basale de l'épithélium de la peau chez la souris entraîne la chute des poils et un plus faible potentiel de régénération à la suite d'une blessure (Elbediwy et al., 2016).

## 2.3 Régulation

Contrairement à plusieurs voies de signalisation dont l'activation dépend de la liaison de ligands connus sur un récepteur membranaire (par exemple Wnt, TGF- $\beta$ , Hedgehog), la voie Hippo n'est pas régulée par un système ligand-récepteur unique. Son activation peut être secondaire à l'action de plusieurs stimuli qui varient grandement selon le tissu étudié.

### 2.3.1 Par l'environnement physique

Une des fonctions les plus étudiées de la voie Hippo est dans la transduction de signaux physiques provenant de l'environnement externe de la cellule et leur intégration afin de permettre une réponse cellulaire appropriée. Il s'agit d'une capacité cellulaire importante dans le développement tissulaire et l'homéostasie afin de proliférer, migrer, entrer en apoptose ou se différencier en réponse aux conditions extracellulaires. La plupart des cellules perçoivent leur

environnement physique grâce à des jonctions intercellulaires (jonctions communicantes et serrées, desmosomes) ou par des adhésions focales à la matrice extracellulaire.

Les nombreuses jonctions communicantes reliant les cellules dans un contexte de haute densité est un des principaux facteurs inhibiteurs de la prolifération par un processus appelé « inhibition de contact ». Cette inhibition est principalement médiée par l'activation de la voie Hippo (Zhao et al., 2007, Ota and Sasaki, 2008). Il a été rapporté que la haute densité cellulaire entraîne l'activation de LATS1/2 par MST1/2 et MAP4K, ce qui conduit à la phosphorylation de YAP1 (Dobrokhotov, Samsonov, Sokabe et Hirata, 2018). La régulation adéquate de plusieurs composants des jonctions communicantes, tels que la cadhérine E ainsi que les caténines  $\alpha$  et  $\beta$ , a été démontré comme importante pour la localisation de YAP1 (Kim, Koh, Chen et Gumbiner, 2011; Silvis et al., 2011).

Les protéines de la famille AMOT, des composants importants des jonctions serrées, se lient directement à YAP1/TAZ et empêchent leur localisation nucléaire (Zhao et al., 2011). Il a été démontré qu'elles peuvent aussi entraîner la phosphorylation de YAP1 indirectement par l'activation de LATS1 par NF2 (Li et al., 2015).

La cellule détecte la présence et la densité de la matrice extracellulaire par des adhésions focales. Il est démontré que l'attachement à une matrice extracellulaire rigide permet l'étalement cellulaire et induit la localisation nucléaire de YAP1/TAZ (Dupont et al., 2011). Le détachement cellulaire, au contraire, entraîne la localisation cytoplasmique de YAP1 (Zhao et al., 2012). Ces processus sont médiés en partie par l'action des Rho GTPases et la réorganisation du cytosquelette d'actine (Cai, Wang et Meng, 2021). La polymérisation de l'actine (la formation de filaments d'actine à partir de ses monomères) a été démontrée à de nombreuses reprises comme un acteur important dans l'inactivation de la voie Hippo (Cheng et al., 2015; Sansores-Garcia et al., 2011; Seo et Kim, 2018).

### 2.3.2 Par les GPCRs

Les récepteurs couplés à une protéine G sont une famille importante de récepteurs membranaires activée par des molécules solubles dans le milieu extracellulaire. Leur activation entraîne leur association à des protéines G qui permettent ensuite la transmission du signal par

différents effecteurs intracellulaires. Plusieurs membres de la famille des GPCR modulent l'activité de la voie Hippo (Luo et Yu, 2019). Par exemple, le LPA et le S1P entraînent la déphosphorylation de YAP1/TAZ par l'activation des sous-unités  $G\alpha_{12/13}$  et  $G\alpha_{q/11}$  de leur récepteur et par l'action des Rho GTPases (Yu et al., 2012). Au contraire, il a été démontré que les récepteurs couplés à une sous-unité  $G\alpha_s$  peuvent activer la voie Hippo par la phosphorylation de LATS1/2 à travers l'action de l'AMPc et de la PKA (Yu et al., 2013; Yu et al., 2012).

### 2.3.3 Par l'interaction avec d'autres voies de signalisation

L'interaction entre la voie Hippo et la voie TGF- $\beta$ /SMAD a été démontrée dans l'inhibition de contact. À haute densité cellulaire, YAP1/TAZ forment un complexe cytoplasmique avec les facteurs de transcription SMAD2/3, ce qui prévient leur accumulation nucléaire et l'activité transcriptionnelle de la voie TGF- $\beta$  (Grannas et al., 2015; Varelas et al., 2010). Cette même interaction a été rapportée dans le renouvellement des cellules souches embryonnaires (Varelas et al., 2008). SKI et SKIL (aussi SnoN), deux régulateurs négatifs de la voie TGF- $\beta$ /SMAD, peuvent moduler l'activité de YAP1/TAZ en se liant à LATS2 (Rashidian et al., 2015; Zhu et al., 2016).

La signalisation Wnt peut être divisée en voie canonique (dépendante de l'action de la  $\beta$ -caténine, un co-régulateur de la transcription) ou non canonique. Lorsque la voie Wnt canonique est inactive, la  $\beta$ -caténine est phosphorylée par GSK3 $\beta$  et est maintenue dans un complexe de destruction cytoplasmique. Il a été démontré que YAP1/TAZ peuvent être incorporés dans ce complexe et que, dans ce cas, leur translocation nucléaire est dépendante de l'activation de la voie Wnt (Azzolin et al., 2014). L'activation non canonique de la voie Wnt par le ligand WNT5B augmente les niveaux nucléaires de YAP1/TAZ et induit l'expression de *Ccn1/2* (Park et al., 2015). Les protéines DVL, des composants de la voie Wnt, ont été rapportées comme étant impliquées dans la régulation de la localisation de YAP1 (Lee et al., 2018). Par exemple, l'inhibition de *Dvl3* entraîne la rétention nucléaire de YAP1, même sous des conditions de culture à haute densité.

L'activation de la voie Notch a été rapportée comme entraînant la transcription de *Yap1* dans les cellules souches neuronales (Li, Hibbs, Gard, Shylo et Yun, 2012) et dans une lignée de cellules tumorales musculaires (Slemmons et al., 2017). Elle augmente l'activité transcriptionnelle de YAP1/TAZ une lignée tumorale hépatocytaire (Kim et al., 2017).

Les microARNs sont des petits ARNs non codants mesurant une vingtaine de paires de bases qui permettent la régulation post-transcriptionnelle spécifique des ARNm. Plusieurs microARNs ont été identifiés comme régulateurs de l'expression d'effecteurs de la voie Hippo dans différents cancers (Samji, Rajendran, Warriar, Ganesh et Devarajan, 2021). Toutefois, leur rôle dans la régulation de la voie Hippo dans le cadre de la physiologie normale est encore peu décrit.

## **2.4 Stratégies thérapeutiques d'inhibition**

L'inhibition de l'activité transcriptionnelle de YAP1/TAZ est une stratégie thérapeutique intéressante pour le traitement des nombreux cancers pour lesquels la voie Hippo est dérégulée. Toutefois, aucune molécule ciblant la voie Hippo n'est présentement disponible sur le marché dans cette optique. Les principales molécules utilisées en recherche sont présentées dans cette section selon si elles agissent en amont de la voie ou si elles agissent au niveau de l'interaction YAP1/TAZ-TEAD. Il est à noter que plusieurs autres molécules sont présentement en développement (Barry, Simov, Valtingojer et Venier, 2021; Nakatani et al., 2016).

### **2.4.1 Inhibition de la voie Hippo en amont**

La voie métabolique du mévalonate est impliquée dans la synthèse du cholestérol. En inhibant l'enzyme limitante de la voie du mévalonate (la HMG-CoA réductase), les statines sont utilisées depuis plusieurs décennies en médecine pour leur effet hypocholestérolémiant (Stancu et Sima, 2001). Un des métabolites dérivés de la voie du mévalonate, le géranylgéranyl-pyrophosphate est requis pour l'activation des Rho GTPases (Sorrentino et al., 2014). Puisque l'activation de ces dernières est impliquée dans la déphosphorylation de YAP1/TAZ (voir [section 2.3.2](#)), l'utilisation des statines a démontré un effet inhibiteur sur l'activité transcriptionnelle de la voie Hippo (Mi et al., 2015; Sorrentino et al., 2014). Par un mécanisme similaire, les inhibiteurs de la géranylgéranyl-transférase parviennent aussi à inhiber la localisation nucléaire de YAP1/TAZ (Sorrentino et al., 2014).

### **2.4.2 Inhibition de l'interaction YAP1-TEAD**

La stratégie la plus éprouvée d'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la voie Hippo est par l'inhibition directe de l'interaction YAP1/TEAD. La vertéporphine (VP) est la molécule la

plus fréquemment utilisée à cet égard. Son efficacité dans l'inhibition de l'oncogénicité de YAP1 a été démontrée pour la première fois dans un modèle murin de cancer hépatique (Liu-Chittenden et al., 2012). Les auteurs de cette étude ont suggéré le mécanisme d'action suivant; la liaison VP-YAP1 induit un changement de conformation de YAP1, ce qui empêche l'interaction YAP1/TEAD2 subséquente. Le mécanisme exact reste encore toutefois à être précisé (Holden et Cunningham, 2018).

Par le chevauchement dans leurs sites de liaison respectifs sur les TEADs, les protéines de la famille VGLL compétitionnent avec YAP1/TAZ pour la liaison à ces facteurs de transcription (voir [section 2.1.3.3](#)) (Jiao et al., 2014; Pobbati, Chan, Lee, Song et Hong, 2012; Zhang, Gao, et al., 2014). D'ailleurs, il a été démontré que le domaine TDU de liaison de VGLL4 à TEAD était suffisant pour inhiber l'interaction YAP1/TEAD (Jiao et al., 2014). Le peptide 17 (Zhang, Lin, et al., 2014) et les acides flufénamique et niflumique (Pobbati et al., 2015) sont d'autres molécules utilisées dans la littérature qui compétitionnent avec YAP1 pour la liaison aux TEADs.

### **3. Hippo dans le système reproducteur femelle**

Depuis la caractérisation de la désactivation génique de *Lats1* chez la souris en 1999 (St John et al., 1999) et particulièrement depuis la dernière décennie, de plus en plus d'éléments témoignent du rôle joué par la voie Hippo dans le système reproducteur femelle. Plusieurs preuves démontrent une implication certaine de la voie Hippo dans les processus physiologiques et pathophysiologiques de l'ovaire et de l'utérus. Toutefois, les mécanismes exacts impliqués dans ces processus restent encore à être caractérisés plus en détail.

#### **3.1 Hippo dans l'ovaire**

Les premiers indices de son implication dans la physiologie ovarienne sont parvenus avec la caractérisation de modèles de souris transgéniques. La majorité des souris *Lats1*<sup>-/-</sup> est infertile, leurs ovaires ne contiennent que peu de follicules antraux et jamais de corps jaunes (St John et al., 1999). Les ovaires des nouveau-nés présentent de hauts niveaux d'apoptose dans leurs cellules germinales et leur culture ex vivo provoque une réduction du nombre de follicules

primordiaux (Sun, Pepling et Diaz, 2015). Concordant avec le rôle de *Lats1* en tant que gène suppresseur de tumeur, les souris développent aussi des tumeurs stromales ovariennes avec l'âge (St John et al., 1999). Les souris avec une délétion génique de *Taz* ont des portées de tailles réduites (Hossain et al., 2007). Toutefois, la cause de cette sous-fertilité n'a jamais été examinée. Au courant des années suivantes, les études subséquentes ont permis de confirmer l'implication de la voie Hippo dans la fonction ovarienne normale. Elle a été démontrée comme participant au recrutement et à la croissance folliculaire ainsi qu'à l'ovulation. Sa dérégulation est d'ailleurs impliquée dans la pathophysiologie de du cancer ovarien.

### 3.1.1 Localisation des effecteurs

L'expression des ARNm et des protéines de la plupart des effecteurs de la voie Hippo (tels que *Mst1/2*, *Sav1*, *Lats1/2*, *Yap1* et *Taz*) a été démontré dans l'ovaire autant chez la souris (Kawamura et al., 2013; Sun et al., 2015; Xiang et al., 2015) que chez la femme (Kawamura et al., 2013). Dans les CGs, l'expression de MST1/2, SAV1 et LATS1/2 est majoritairement cytoplasmique (Kawamura et al., 2013). YAP1/TAZ sont fortement exprimés dans les CGs de tous les stades folliculaires (Kawamura et al., 2013; Sun et al., 2015). Toutefois, leur expression est réduite dans le corps jaune (Ji et al., 2017; Kawamura et al., 2013; Sun et al., 2015). Les résultats des études sur la localisation intracellulaire de YAP1/TAZ dans les CGs des follicules antraux s'opposent. Cependant, il est clair que YAP1 est majoritairement localisé dans le cytoplasme des cellules lutéales (Fu et al., 2014; Ji et al., 2017; Lv et al., 2019). Les cellules lutéales possèdent des niveaux de phosphorylation plus élevés de YAP1 que les CGs (Lv et al., 2019). Très peu d'études se sont intéressées à la voie Hippo dans les cellules de la thèque. L'expression de MST1/2, SAV1, LATS1/2 et TAZ y est principalement cytoplasmique (Kawamura et al., 2013). LATS1/2 y sont d'ailleurs plus faiblement exprimés que dans les CGs (Sun et al., 2015).

L'expression de YAP1 a été démontrée à partir du jour embryonnaire 15,5 jusqu'à l'âge adulte dans les cellules germinales femelles (Abbassi et al., 2016). LATS1/2 et YAP1 sont localisés dans le cytoplasme de l'ovocyte de tous les stades folliculaires (Abbassi et al., 2016; Sun et al., 2015). La délétion de *Yap1* spécifique à l'ovocyte n'a aucun effet sur la formation des follicules primordiaux, leur activation, leur croissance ou même sur la fertilisation (Yu et al., 2016). De plus, de hauts niveaux de phosphorylation de YAP1 sont détectés dans les ovocytes de follicules en

croissance (Abbassi et al., 2016). Ces données suggèrent que l'activation de la voie Hippo dans l'ovocyte n'est pas nécessaire à aucune étape des processus d'ovogenèse et de folliculogénèse.

### 3.1.2 Recrutement de la réserve folliculaire

La fragmentation mécanique de l'ovaire entraîne l'activation des follicules primordiaux en quiescence (Kawamura et al., 2013). L'inactivation de la voie Hippo constitue un des mécanismes impliqués dans ce phénomène. Kawamura et al. ont en effet démontré une diminution de la phosphorylation de YAP1, une augmentation de sa localisation nucléaire ainsi qu'une augmentation de l'expression de plusieurs membres des familles CCN et BIRC dans les CGs d'ovaires murins fragmentés (Kawamura et al., 2013). L'inactivation de la voie Hippo dans ce contexte est médiée par la polymérisation de l'actine. D'ailleurs, le traitement d'ovaire en culture par JASP et S1P (deux molécules entraînant la polymérisation de l'actine sans dommage mécanique aux tissus), conduit à un plus grand nombre de follicules de stade antral et à une augmentation des niveaux de *Ccn2* (Cheng et al., 2015). Le traitement *in vivo* de souris à la VP suivi par la fragmentation mécanique des ovaires entraîne une plus faible expression de CCN2, un nombre plus élevé de follicules primordiaux et un nombre réduit de follicules de stade secondaire avancé (Kawamura et al., 2013). À l'inverse, l'expression d'un transgène *Yap1* constitutivement actif promeut la croissance folliculaire dans des greffons ovariens humains et murins (Cheng et al., 2015). L'inhibition génique *ex vivo* de *Yap1* dans des ovaires de souris de 3 jours, âge correspondant à la scission des grappes ovocytaires, se solde en un nombre plus élevé de follicules primordiaux et un nombre réduit de follicules primaires, tandis que sa surexpression entraîne des changements inverses (Hu et al., 2019). Cette surexpression permet d'ailleurs de limiter l'augmentation du nombre de follicules primordiaux et la réduction du nombre de follicules primaires entraînées par la dérégulation de la voie AKT (Hu et al., 2019). Aussi, le traitement d'explants ovariens murins avec des protéines recombinantes de la famille CCN entraîne la croissance folliculaire, ce qui confirme leur implication dans ce processus (Kawamura et al., 2013). Dans leur ensemble, ces résultats démontrent que l'inactivation de la voie Hippo est impliquée dans le processus de recrutement des follicules de la réserve folliculaire. Toutefois, sa possible interaction avec la cascade PI3K-AKT-FOXO3 ou avec les effecteurs TSC1/2 et mTORC1 dans l'activation des follicules primordiaux reste encore à être investiguée.



### 3.1.3 Folliculogénèse et réponse à la FSH

La voie Hippo est impliquée dans la prolifération et l'apoptose des CGs et dans la croissance folliculaire. Il a été démontré que l'inhibition génique de *Yap1* et/ou de *Taz* par de petits ARNs interférents résulte en une diminution de la prolifération des CGs bovines (Plewes et al., 2019), murines (Ji et al., 2017) et tumorales humaines (Fu et al., 2014). Conséquemment, la surexpression de YAP1 dans les CGs entraîne en une augmentation significative de leur prolifération (Fu et al., 2014). La présence de VP dans le milieu de culture d'ovaires murins immatures prévient la formation de follicules antraux et résulte en une diminution des niveaux de Ki-67 dans les CGs (Lv et al., 2019). En utilisant un modèle murin de délétion spécifique aux CGs, Lv et al. sont parvenus à démontrer que la perte de *Yap1* entraîne une augmentation de l'apoptose des CGs et la formation de follicules antraux morphologiquement anormaux. Les souris sont sous-fertiles et leurs ovaires possèdent un nombre réduit de follicules antraux et de corps jaunes (Lv et al., 2019).

La voie Hippo est aussi impliquée dans la fonction stéroïdogène des CGs. Il a été démontré que la stimulation des CGs murines par la FSH active Hippo en augmentant la phosphorylation de YAP1 à la sérine 127 (Puri et al., 2016). L'inhibition génique de *Yap1* cause une augmentation de l'expression de plusieurs gènes clés de la stéroïdogenèse (*Cyp19a1*, *Fshr*, *Star*) (Lv et al., 2019). En ce sens, la surexpression de YAP1 entraîne une diminution de la production d'estradiol par les cellules (Lv et al., 2019). Toutefois, certains résultats suggèrent que l'inactivation de la voie Hippo est nécessaire à la fonction des CGs en mettant en évidence que la perte de *Yap1* a un impact négatif sur l'induction de l'expression de l'aromatase et sur la production d'estradiol en réponse à la FSH (Fu et al., 2014; Plewes et al., 2019).

Dans leur ensemble, les études indiquent que l'inactivation de la voie Hippo est nécessaire au développement folliculaire du fait de ses implications dans la prolifération et l'apoptose des CGs. Toutefois, les résultats divergent quant à son rôle dans l'activité stéroïdogène des cellules.

### 3.1.4 Ovulation et réponse à la LH

L'activation de la voie Hippo est requise dans la différenciation finale des CGs murales prolifératives en cellules lutéales initiée par le pic de LH durant l'ovulation. In vivo, le stimulus

ovulatoire par l'hCG entraîne l'augmentation de la phosphorylation de MST1/2, ainsi que la diminution des niveaux de YAP1 dans les follicules pré-ovulatoires et dans les cellules lutéales qui en résulte (Ji et al., 2017). Ceci concorde avec la présence de YAP1 réduite dans les corps jaunes (voir [section 3.1.1](#)). Le traitement in vitro des CGs à la FSK+PMA (un traitement qui mime les effets de la LH) entraîne un changement dans la localisation de YAP1, qui devient majoritairement cytoplasmique, et entraîne une augmentation de sa phosphorylation sur la sérine 127 (Ji et al., 2017; Lv et al., 2019). Les résultats de Ji et al. suggèrent une implication de la voie ERK1/2 dans cette inactivation de la voie Hippo. L'injection d'hCG à des souris ayant une déficience en *Erk1/2* n'a pas d'effet sur les niveaux totaux ou phosphorylés de YAP1, tout comme l'ajout d'un inhibiteur de ERK1/2 à la culture de CGs (Ji et al., 2017). La surexpression de *Yap1* par un adénovirus dans des CGs en culture empêche l'induction normale d'*Areg*, *Ereg*, *Sult1e1* et *Tnfrsf25* (Ji et al., 2017). À l'inverse, l'utilisation de petits ARNs interférents ciblant *Yap1* résulte en l'induction accrue de *Areg*, *Btc*, *Cyp11a1*, *Ereg*, *Lhcgr* et *Sult1e1* en réponse à la LH (Ji et al., 2017; Lv et al., 2019). Par ailleurs, l'inhibition génique de *Yap1* augmente les niveaux basaux de *Lhcgr* (Ji et al., 2017).

La régulation de la voie EGFR semble être un des mécanismes par lequel YAP1 intervient dans la signalisation de la LH. Dans un modèle de CGs bovines, il a été démontré que l'inhibition pharmacologique de la voie Hippo par la VP ou par P17 n'a aucun effet sur *Lhcgr*, mais prévient l'induction normale d'*Egfr*, *Ereg* et *Tnfrsf25* en réponse au signal ovulatoire (Dos Santos, Lalonde-Larue, et al., 2021). Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont utilisé un système d'injection intra-folliculaire échoguidée pour démontrer que le traitement de follicules dominants bovins à la VP avant l'ovulation prévient la rupture folliculaire. Il a été rapporté que l'inhibition génique de *Yap1* entraîne la sous-expression marquée de *Areg* et *Egfr* (Lv et al., 2019), deux acteurs importants de la cascade de signalisation de la LH. Malgré le fait qu'*Areg* ait été démontré comme une cible transcriptionnelle directe de YAP1 (Zhang et al., 2009) et de TAZ (Kim et al., 2020) dans les cellules épithéliales, la possible implication de la voie Hippo dans sa régulation génique dans les CGs et dans la cascade de signalisation de la LH reste encore à être investiguée.

La voie Hippo est aussi impliquée dans la différenciation des cellules du cumulus induite par l'ovulation. Des résultats récents démontrent que l'induction in vivo ou in vitro de l'expansion du cumulus entraîne une augmentation de la phosphorylation de YAP1 dans les CGs des COCs

(Sun et Diaz, 2019). Par ailleurs, la présence de VP dans le milieu de culture induit une expansion du cumulus, ainsi qu'une augmentation de l'expression de ses marqueurs clés (*Has2*, *Ptgs2*, *Ptx3*, *Tnfaip6*), et ce, en absence d'un signal ovulatoire. Le traitement à la VP augmente aussi certains gènes stéroïdogènes (*Cyp11a1*, *Star*) et la production de progestérone (Sun et Diaz, 2019).

Dans leur ensemble, ces résultats indiquent que l'activation de la voie Hippo durant le processus ovulatoire est nécessaire à la différenciation adéquate des CGs murales et du cumulus.

### 3.1.5 Cancer ovarien

Tel que mentionné dans la [section 2.2.2](#), la dérégulation de la voie Hippo est impliquée dans le développement de cancers de plusieurs organes. L'ovaire n'y fait pas exception. Les cancers ovariens d'origine épithéliale sont les plus fréquents (90%) et les plus létaux (Torre et al., 2018). Les autres types proviennent des cellules germinales ou des cellules stromales. L'analyse génomique de patients atteints de cancer ovarien a démontré que YAP1 et TAZ y sont fréquemment surexprimés (Wang, He, Dong, Meyer et Xu, 2020). La forte expression de YAP1 est d'ailleurs associée à un faible taux de survie (Hall et al., 2010; He et al., 2015; Xia et al., 2014; Zhang et al., 2011). Plusieurs études ont démontré que YAP1 accentue la malignité des cellules épithéliales ovariennes en augmentant la prolifération, la migration, l'invasion et la croissance cellulaire indépendante de l'ancrage (Hall et al., 2010; Xia et al., 2014; Zhang et al., 2011). YAP1 est aussi impliqué dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques classiquement utilisés pour traiter les cancers ovariens d'origine épithéliale (Xia et al., 2014; Zhang et al., 2011). Certains microARNs ont d'ailleurs été impliqués dans la tumorigénicité de lignées cellulaires ovariennes par la modulation de la voie Hippo (Tan et al., 2015; Xu, Xiao, et al., 2018). L'expression de YAP1 dans les tumeurs de CGs humaines est principalement nucléaire et est plus élevée que dans le tissu ovarien normal (Fu et al., 2014). *Yap1* joue d'ailleurs un rôle important dans la prolifération, la migration et la stéroïdogénèse des cellules tumorales de la granulosa (Fu et al., 2014).

## 3.2 Hippo dans l'oviducte et dans l'utérus

Très peu de recherches se sont intéressées aux rôles de la voie Hippo dans l'oviducte. Dans l'oviducte normal, YAP1 est principalement exprimé dans le cytoplasme des cellules épithéliales. Toutefois, son expression est beaucoup plus élevée et principalement nucléaire dans l'épithélium

inflammatoire et cancéreux (Hua et al., 2016). L'amplification du gène *Yap1* et de ceux de la famille TEAD, ainsi que l'atténuation de *Lats1* sont des altérations fréquentes dans le carcinome séreux de haut grade (Hua et al., 2016), une tumeur épithéliale ovarienne se développant à partir des cellules sécrétrices de l'épithélium de l'oviducte.

La dérégulation de la voie a été démontrée dans plusieurs pathologies gynécologiques comme les cancers endométrial et cervical (Wang et al., 2020), mais très peu d'études se sont intéressées à la voie de signalisation Hippo dans l'utérus adulte normal. Plusieurs effecteurs de la voie sont exprimés dans l'utérus chez la femme et l'expression de certains d'entre eux varie selon le cycle menstruel (Strakova, Kruss, Morris et Reed, 2010), ce qui suggère une implication de la voie Hippo dans la physiologie utérine. Notamment, les niveaux protéiques de TAZ dans les cellules stromales diminuent durant la phase sécrétoire du cycle menstruel, la phase de préparation de l'utérus à la nidation (Strakova, Reed et Ihnatovych, 2010). La régulation de YAP1 est différente, son expression augmente à la suite de l'induction in vitro de la décidualisation et est plus élevée dans l'utérus nouvellement gestant (Chen et al., 2017). D'ailleurs, l'inhibition génique ou pharmacologique de YAP1 dans les cellules stromales endométriales nuit au processus de décidualisation normal en diminuant la prolifération et en augmentant l'apoptose de ces cellules, accompagnée par une diminution de l'expression de *Tead1* et de *Ccn2* (Song et al., 2016). De manière concordante avec ces derniers résultats, l'utérus murin présente une augmentation des niveaux de CCN2 dans les cellules stromales endométriales au moment de la nidation (Rageh, Moussad, Wilson et Brigstock, 2001; Surveyor, Wilson et Brigstock, 1998). Ces résultats suggèrent que la régulation de la voie Hippo est impliquée dans la physiologie utérine dans le processus de décidualisation.

La seule étude fonctionnelle conduite jusqu'à présent sur le rôle de la voie Hippo dans le développement du tractus reproducteur femelle a permis de démontrer que la perte d'expression de *Lats1/2* dans les cellules du mésenchyme des canaux de Müller conduit à un destin myofibroblastique (St-Jean, Tsoi, et al., 2019). Les défauts développementaux de l'oviducte et de l'utérus engendrés par cette délétion sont en partie causés par une surexpression de YAP1/TAZ et par une augmentation de l'activité transcriptionnelle de *Ccn2* (St-Jean, Tsoi, et al., 2019).

## **Chapitre 2 – Hypothèse et objectifs**

Par souci de transparence et de cohérence, je considère important d'exposer l'hypothèse et l'objectif tels qu'ils étaient lors de l'élaboration de ce projet de thèse.

Considérant les preuves croissantes de l'investigation de la voie de signalisation Hippo et de ses co-régulateurs YAP1/TAZ dans plusieurs processus ovariens (voir [section 3.1](#)), nous avons initialement posé l'hypothèse selon laquelle YAP1/TAZ sont impliqués dans les processus ovariens de croissance et d'atrésie folliculaire, d'ovulation et de maintien du corps jaune.

Notre objectif initial était de caractériser les rôles de YAP1/TAZ dans la physiologie ovarienne en utilisant des modèles murins transgéniques de leur délétion dans les cellules de la granulosa.

Par suite de nos difficultés à générer un modèle murin transgénique efficace de délétion de YAP1/TAZ dans l'ovaire, de l'apparition d'un phénotype de dilatation des oviductes et à la lumière de certains résultats initiaux obtenus, l'hypothèse et les objectifs du projet furent modifiés :

**Hypothèse :** Chez la souris, la voie Hippo et ses co-régulateurs YAP1/TAZ sont requis pour le développement postnatal de l'oviducte et participent à la régulation du processus ovulatoire.

**Objectifs :**

- 1) Caractériser le rôle de YAP1/TAZ dans le développement de l'oviducte à l'aide du modèle murin *Yap1<sup>flox/flox</sup>;Taz<sup>flox/flox</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>*. (Premier article)
- 2) Caractériser les interactions entre la voie Hippo et la cascade de signalisation de la LH dans les cellules de granulosa murines durant l'ovulation. (Second article)

**Chapitre 3 – YAP1/TAZ dans le développement de l’oviducte  
(Premier article)**

## **YAP and TAZ are required for the postnatal development and the maintenance of the structural integrity of the oviduct**

Philippe Godin<sup>1,2</sup>, Mayra Tsoi<sup>1,2</sup>, Marilène Paquet<sup>2,3</sup> et Derek Boerboom<sup>1,2</sup>

Affiliations :

<sup>1</sup>Département de biomédecine vétérinaire, <sup>2</sup>Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité et

<sup>3</sup>Département de pathologie et de microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, J2S 2M2, QC, Canada.

Auteur de correspondance : [derek.boerboom@umontreal.ca](mailto:derek.boerboom@umontreal.ca)

Mots-clés : Hippo, Yap, Taz, Müllerian duct, oviduct, isthmus, myosalpinx, embryo transport, smooth muscle cell

Article publié dans la revue *Reproduction* en août 2020 (Godin, Tsoi, Paquet et Boerboom, 2020)

<https://doi.org/10.1530/REP-20-0202>

Contribution des auteurs :

PG a géré la colonie de souris et a généré et analysé la quasi-totalité des résultats. PG a rédigé la première version du manuscrit et en a effectué les corrections. MT a établi la colonie et généré les résultats préliminaires. MP a interprété les défauts pathologiques macroscopiques et histologiques du phénotype. PG et DB ont établi le design expérimental et interprété les résultats. DB a révisé la version préliminaire du manuscrit et contribué à sa rédaction. Tous les co-auteurs ont révisé la forme finale du manuscrit.



### 3.1 Résumé

The development of the Müllerian ducts into the female reproductive tract requires the coordination of multiple signaling pathways that regulate proliferation, apoptosis and differentiation. The Hippo pathway has been reported to interact with several pathways with established roles in Müllerian duct development, yet its potential roles in reproductive tract development and function remain mostly uncharacterized. The objective of this study was therefore to characterize the roles of the Hippo transcriptional coactivators YAP and TAZ in the female reproductive tract using transgenic mouse models. This report shows that the concomitant conditional inactivation of *Yap* and *Taz* in the mouse Müllerian duct mesenchyme results in postnatal developmental defects of the oviduct. Most notably, discontinuities in the myosalpinx layer led to the progressive formation of cystic dilations of the isthmus. These defects prevented embryo transport and subsequent implantation in older animals, causing infertility. The loss of YAP/TAZ did not appear to affect other biological processes known to be required for the maintenance of oviductal wall integrity, such as TGF- $\beta$ /SMAD and Notch signaling and the biogenesis of miRNAs, suggesting that the Hippo pathway acts independently of these processes to direct oviduct development. Taken together, these results suggest redundant and essential roles for YAP and TAZ in the postnatal development of the oviduct and the maintenance of its structural integrity.

### 3.2 Introduction

The Müllerian ducts (or paramesonephric ducts) are a pair of simple tubular structures present during embryogenesis that give rise to the oviducts, uterus and upper third of the vagina. Müllerian duct development is divided into three major steps; specification of Müllerian duct precursors at the cranial pole of the mesonephros, their invagination into the underlying mesenchyme with formation of the lumen, and the caudal elongation of the ducts until they fuse with the urogenital sinus (Roly et al., 2018). These steps require tightly synchronized signals, mediated by multiple signaling pathways and regulators, to direct cell proliferation, apoptosis, migration and differentiation. Key mediators of Müllerian duct development include *Lim1*, *Pax2*,

*Emx2* and *Wnt4*, the targeted deletion of which results in complete Müllerian agenesis in the mouse (Kobayashi, Shawlot, Kania et Behringer, 2004; Miyamoto, Yoshida, Kuratani, Matsuo et Aizawa, 1997; Torres, Gomez-Pardo, Dressler et Gruss, 1995; Vainio et al., 1999).

Hippo is an evolutionarily conserved signaling pathway that is involved in several cellular processes including proliferation, apoptosis and differentiation. It is a crucial regulator of morphogenesis, organ size determination and tumorigenesis in many tissues including the heart (Zhou, Li, Zhao et Guan, 2015), liver (Patel, Camargo et Yimlamai, 2017), kidneys (Wong, Meliambro, Ray et Campbell, 2016) and mammary gland (Shi et al., 2015). The Hippo pathway has no specific ligand, but can respond to a variety of stimuli, including cues from the cellular environment such as cellular density, extracellular matrix stiffness and shear stress (Meng et al., 2016). These activate a core kinase cascade that ultimately results in the phosphorylation of the transcriptional co-regulatory proteins Yes-associated protein (YAP) and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) (Zhao et al., 2007). Additional phosphorylation of YAP/TAZ by casein kinase 1 results in their ubiquitination by  $\beta$ -TrCP and subsequent proteasomal degradation (Liu, Zha, et al., 2010; Zhao et al., 2010). Alternatively, phosphorylated YAP/TAZ can also bind proteins of the 14-3-3 family, resulting in their retention in the cytoplasm (Zhao et al., 2007). In the absence of Hippo signaling activity, unphosphorylated YAP/TAZ localize to the nucleus, where they bind various transcription factors (notably those of the TEAD family) to exert their transcriptional regulatory actions (Piccolo et al., 2014). YAP/TAZ transcriptional target genes include those of the CCN family of matricellular proteins (*Cyr61*, *Ctgf*, *Nov*), which are involved in diverse cellular processes such as proliferation, adhesion, extracellular matrix production, differentiation and apoptosis (Lau et Lam, 1999). Although their biological roles are distinct (as evidenced by the divergent phenotypes of their respective knockout mouse models (Hossain et al., 2007; Morin-Kensicki et al., 2006)), YAP and TAZ have been shown to act in a functionally redundant manner in several cellular contexts (Plouffe et al., 2018). In addition to their roles as transcriptional co-regulators, YAP/TAZ have also been shown to interact with components of other pathways such as Wnt, transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) and Notch (Hansen, Moroishi et Guan, 2015), thereby modulating their signaling activity. In addition, YAP has been

reported to regulate miRNA processing by interacting with components of the miRNA biogenesis machinery (Chaulk, Lattanzi, Hiemer, Fahlman et Varelas, 2014; Mori et al., 2014).

Little information exists regarding the roles played by the Hippo pathway in the female reproductive tract. Strakova *et al.* reported that in vitro decidualization of human uterine fibroblasts is accompanied by a decrease in TAZ levels, which also occurs in the endometrium during the early stages of baboon pregnancy (Strakova, Reed, et al., 2010). Chen *et al.* reported that YAP expression is higher in human decidual cells from early pregnant decidua in comparison with the non-pregnant endometrium, and that knockdown of YAP expression in cultured endometrial stromal cells interferes with decidualization in vitro (Chen et al., 2017). Together, these studies suggest that Hippo may play a role in decidualization and the establishment of pregnancy. The only study of Hippo function during reproductive tract development reported thus far examined the phenotype of mice with a conditional deletion of the Hippo kinases *Lats1* and *Lats2* in the mesenchyme cells of the Müllerian duct. Loss of Hippo signaling in targeted cells caused them to lose their multipotency and to commit to the myofibroblast cell fate, resulting in severe developmental defects of the uterus and oviducts (St-Jean, Tsoi, et al., 2019). These changes were caused, at least in part, by markedly increased levels of YAP and TAZ protein levels, which directly drove increased transcriptional activity of *Ctgf*.

To further study roles of YAP and TAZ in female reproductive tract development and function, we generated mouse models to inactivate *Yap* and/or *Taz* in Müllerian mesenchyme cells. Loss of Hippo signaling in the double conditional knockout model resulted in developmental defects of the myosalpinx, causing the isthmi of the oviducts to become progressively dilated. This in turn caused oocytes and blastocysts to become entrapped, resulting in a progressive decrease in fertility. Our findings represent direct evidence of a role for YAP/TAZ in oviduct development, and further identify the Hippo pathway as an important regulator of female reproductive tract development.

### 3.3 Matériel et méthodes

#### ANIMAL MODELS

Mice bearing floxed alleles for *Yap* and/or *Taz* (described in (Xin et al., 2013; Xin et al., 2011), referred to herein as *Yap<sup>f/f</sup>*, *Taz<sup>f/f</sup>* and *Yap/Taz<sup>f/f</sup>*) were graciously provided by Eric Olson (University of Texas Southwestern Medical Center). Genotyping analyses were performed as previously described (Xin et al., 2013; Xin et al., 2011) on DNA extracted from tail biopsies, and using the following PCR conditions: 2 mins at 94°C for one cycle, 30 sec at 94°C, 30 sec at 60°C and 40 sec at 72°C for 35 cycles, and 4 mins at 72°C for one cycle. These mice were mated to the *Amhr2<sup>tm3(cre)Bhr</sup>* (referred to herein as *Amhr2<sup>cre</sup>*) strain (provided by Richard R. Behringer [M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX]) to generate single and double knockout mouse models. Genotyping analyses for *Amhr2<sup>cre</sup>* were conducted as previously described (Jorgez, Klysik, Jamin, Behringer et Matzuk, 2004). Females of the *Gt(ROSA)26Sor<sup>tm9(CAG-tdTomato)Hze</sup>* reporter strain (referred to herein as CAG-tdTomato) were acquired from Jackson Laboratory (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, stock number 007909). Genotyping analyses were performed according to the Jackson Laboratory protocol (protocol #29436, available online at <https://www.jax.org/Protocol?stockNumber=007909&protocolID=29436>, accessed in March 2020) except that GoTaq Green Master Mix was used (Promega Corporation, Madison, WI, USA). All animal procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee and conformed to the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals.

#### BREEDING TRIAL

Six week-old single and double knockout female mice and control littermates (n=6/genotype) were placed in cages with 6 week-old wild type (C57BL/6J) males. Cages were monitored regularly to record intervals between litters and litter sizes. Males were replaced after 6 months, the replacement males were removed 2 months afterward and the experiment concluded 22 days later to allow the birth of a final litter.

#### TISSUE COLLECTION

Ovaries, oviducts and uteri were dissected from 3 wk-, 2 mo-, 6 mo- and 10 mo-old *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* and control littermates and either 1) fixed in 10% formalin and embedded

in paraffin for histopathology analyses, immunohistochemistry or TUNEL analyses, or 2) flash-frozen followed by homogenization for RT-qPCR analysis. Isthmus regions were collected by dissection following uncoiling of the oviducts and the identification of the ampulla-isthmus and uterotubal junctions. 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (B5002 - MilliporeSigma, Burlington, MA, USA) was reconstituted in sterile saline and administered (100 mg/kg, IP) 3 hours prior to tissue collection.

#### OVULATION RATE

Five month-old females (n=6/genotype) were mated with wild-type males and checked daily for the presence of a copulatory plug. On the morning of the identification of the plug, oviducts were isolated, placed in PBS, the cumulus-oocyte complexes (COCs) released from the ampullae by tearing the oviducts with forceps, and the COCs counted under a dissection microscope.

#### ARTIFICIAL INDUCTION OF DECIDUALIZATION

Protocol was based on that of Deb *et al.* (Deb, Reese et Paria, 2006). Briefly, 3 month-old females were mated with vasectomized wild-type males and checked daily for copulatory plugs. Three days following the identification of the plug, decidualization was induced artificially by surgical injection of 20 µl of sesame oil in the lumen of the left uterine horn. The contralateral horn was not injected and acted as a control. Females were euthanized 7.5 dpc, and their uterine horns were weighed and fixed in 10% formalin for further analyses.

#### OVIDUCTAL FLUSH

Oviducts from 5 month-old females (n=6/genotype) were collected at 6.5 dpc and placed in PBS. A 30G needle was inserted through the infundibulum and the oviductal lumen was flushed with PBS to retrieve unfertilized oocytes and embryos as previously described (Deb et al., 2006). These were fixed at room temperature in 4% paraformaldehyde for 40 mins, washed 6 times in PBS with 1% Triton X-100 (Bioshop, Burlington, ON, Canada,) and mounted in a drop of Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). They were then counted and analyzed by fluorescence microscopy using a Leica DMIRB contrast microscope (Leica Microsystems, Concord, ON, Canada).

## STEROID HORMONE MEASUREMENTS

Serum progesterone (P4) levels of 2 month-old pregnant mice were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (IBL America). Assays were done by the Ligand Assay and Analysis Core, University of Virginia, VA, USA.

## IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND TUNEL ASSAYS

Immunohistochemistry analyses were performed using 3  $\mu\text{m}$  sections. Sections probed with primary antibodies against YAP, TAZ, PCNA, Cleaved Caspase-3 (14074, 4883, 2586 and 9661, respectively – Cell Signaling Technology, Danvers, MS, USA), BrdU (M0744 – Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), Ki-67 (NB500-170 – Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), SMAD2 (ab47083 – Abcam, Cambridge, UK), p-SMAD3 (LS-B64 – Lifespan Biosciences, Seattle, WA, USA) and DICER1 and DDX17 (sc-136979 and sc-398168, respectively – Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), were treated with the Vectastain Elite ABC HRP Kit (Vector Laboratories) according to the manufacturer's instructions, followed by staining using the DAB Peroxidase (HRP) Substrate kit (Vector Laboratories). Sections probed with anti-alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) antibody (MU128-UC – BioGenex, Fremont, CA, USA) were treated with Dako REAL EnVision Detection System (K5007 – Agilent Technologies) using a Lab vision autostainer 360 (Thermo-Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. All sections were counterstained with hematoxylin before mounting. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) assay was conducted with the In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red according to the manufacturer's instructions (12156792910 – Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Slides were permeabilized in a 0.1% sodium citrate solution containing 0.1% Triton X-100 and mounted in Vectashield mounting medium with DAPI.

## RT-qPCR AND miRNA ANALYSES

Total RNA and miRNA were extracted using the RNeasy Mini and miRNeasy Micro isolation kits (Qiagen, Montreal, QC, Canada), respectively, and according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and quality were assessed using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo-Fisher Scientific). Total RNA was reverse-transcribed using the SuperScript Vilo cDNA Synthesis Kit (11754050 – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and qPCR reactions consisted of 2.3  $\mu\text{l}$  of  $\text{H}_2\text{O}$ , 6 pmol of each forward and reverse gene-specific primer and 7.5  $\mu\text{l}$  of Advanced qPCR

mastermix with Supergreen (800-435-QL – Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada). Real-time PCR reactions were run using a CFX96 Real-Time System/ C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). The thermal cycling program consisted of: 3 minutes at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95 °C, 30 seconds at 60 °C and 30 seconds at 72 °C. mRNA levels were determined using Bio-Rad CFX Manager Software (Bio-Rad), with the mathematical model according to Pfaffl (Pfaffl, 2001) and using *Rpl19* as the housekeeping gene. Primer sequences are listed in Table S1. RT-PCR and Real-time PCR for *miR-143* were performed using a Taqman MicroRNA Assay (#A25576 - Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) as directed by the manufacturer. *snoRNA202* was used for normalization of miRNA levels.

#### STATISTICAL ANALYSES

Data of the fertility trial were analyzed by a two-way ANOVA followed by a Bonferroni post hoc test for multiple comparisons. RT-qPCR data are presented as mean  $\pm$  SEM and were analyzed by Student's *t*-test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. Analyses were carried using GraphPad Prism software version 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

### 3.4 Résultats

#### **YAP and TAZ are expressed in the Müllerian ducts during embryogenesis**

To characterize YAP and TAZ expression in the developing Müllerian ducts, immunohistochemistry analyses were conducted on ducts isolated from wild-type mice at embryonic day 17.5. Results showed that both proteins were expressed in all Müllerian duct cell types, with localization mainly in the cytoplasm of ductal epithelial cells, and mostly in the nucleus of mesenchyme and coelomic epithelial cells (Figure 1A).

#### ***Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* female mice are subfertile**

To study the function of YAP and TAZ in female reproductive tract development and function, mice bearing floxed alleles for *Yap* and/or *Taz* were mated to mice of the *Amhr2<sup>cre</sup>* strain. *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice were born at the expected Mendelian ratio. To assess fertility, *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* females were mated with wild-type males for eight months. Mutant females

produced on average fewer pups per litter ( $P < 0.001$ ) (Table 1). Although the fertility of *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* females was comparable to controls at the first litter, it declined progressively during the trial ( $P < 0.01$ ), and no mutant mice produced pups past 7 months of age, whereas the majority of the controls (5/6) did (Figure 1B). *Yap<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* and *Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* single conditional knockout models were as fertile as their respective controls and no phenotypic abnormalities were apparent (not shown), indicating that *Yap* and *Taz* are functionally redundant in this context.

### **Normal ovarian and uterine function in *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice**

To investigate the cause of subfertility in the *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* model, we examined the morphology and function of the principal tissues targeted by the *Amhr2<sup>cre</sup>* allele (i.e., reproductive tract structures derived from the Müllerian mesenchyme and ovarian follicular granulosa cells (Jamin, Arango, Mishina, Hanks et Behringer, 2002)). Ovarian weights were similar between experimental and control females (Figure 1C). Histological analyses revealed that all follicular stages and *corpora lutea* were present in the ovaries of adult *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice, and no morphological abnormalities were detected (not shown). Ovulation efficiency following natural mating was assessed in 5 month-old mice, age at which fertility is reduced in *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* females (Figure 1B). The number of COCs retrieved from the oviduct ampullae of *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice was not significantly different from the controls (Figure 1D). Analyses of serum progesterone levels in pregnant females at 7.5 dpc showed comparable levels between experimental and control females (Figure 1E), suggesting that smaller litter sizes were not due to luteal insufficiency. Analyses of *Yap* and *Taz* mRNA levels in adult *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* ovaries were similar to controls (Figure 1F), and immunohistochemistry analyses of YAP and TAZ expression also showed no differences between groups (Figure S1A). Together, these findings indicate that knockdown of *Yap* and *Taz* expression was inefficient in the ovary of the *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* model, and that ovarian function was unaffected.

As for the ovary, no obvious histological changes were observed in the uterus of *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice (not shown). As the *Amhr2<sup>cre</sup>* allele drives Cre expression in the stromal and decidual cells, decidualization was assessed by injection of oil in the lumen of the left uterine



horn of pseudopregnant females (Figure 2A). This resulted in similar uterine weight increases in *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* relative to controls ( $4.5 \pm 1.4$  fold increase in comparison to contralateral horn vs  $4.9 \pm 2.2$  fold). Deciduomas were histologically indistinguishable between groups (Figure 2B). Furthermore, decidual tissue was examined in pregnant females 7.5 dpc. This was also histologically indistinguishable between mutant and control mice, and BrdU incorporation analyses showed similar levels of proliferation of decidual cells in both groups (Figure 2C). The myometrium (also targeted by the *Amhr2<sup>cre</sup>* allele) was similarly unaffected in mutant mice (not shown). Likewise, no evidence of increased embryo mortality or resorption was found in pregnant *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice (not shown). Evaluation of uterine *Yap* and *Taz* expression showed unchanged mRNA levels in 2 month-old *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice (Figure 2D), and immunohistochemistry analyses also indicated similar expression levels between experimental and control females (Figure S1B). These results therefore suggest that, as in the ovary, knockdown of *Yap* and *Taz* expression was inefficient in the uterus of the *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* model, and that decreased litter sizes were not due to inadequate uterine function.

### **Oviduct defects in *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice**

Gross examination of the reproductive tracts of 10 month-old *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* females at the end of the fertility trial revealed marked bilateral cystic dilation of their oviducts (Figure 3A). These dilations were often multilobulated, lined by thin, translucent walls and were located exclusively the isthmic region. In some cases, they were comparable in size to the ovary, and most appeared to contain cellular debris that was visible through the oviduct wall. To study the development of these cystic dilations, we also evaluated the macroscopic appearance of the oviducts of 3 wk-, 2 mo- and 6 mo-old mice. Oviducts from 3 week-old mice were indistinguishable from the controls. Half (3/6) of the 2 month-old mice had small dilations (less than the width of the oviduct) which did not contain debris. The other half had no dilations, but the external appearance of their oviducts was nonetheless distinguishable from the controls due to the presence of irregular bends and kinks (not shown). Oviducts from 6 month-old animals were very similar to those observed at 10 months of age (Figure 3A). Histological analyses showed the oviductal cystic dilations of 10 month-old mutant animals to consist of a thin wall lined by an

attenuated cuboidal epithelium surrounded by a thin stroma and outer serosa (Figure 3B).  $\alpha$ -smooth muscle actin immunohistochemistry showed the isthmus myosalpinx of 3 week-old *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* animals to be similar to controls. However, at 2 months of age, it was noticeably thinner and discontinuous in some areas. In 10 month-old animals the myosalpinx was thin, discontinuous, and completely absent in the most dilated areas (Figure 3C). The oviduct dilations appeared to originate from the localized defects in the myosalpinx, suggesting they represented structural weak points at which oviductal intra-luminal pressure caused the dilations to arise (Figure 3C).

The *Amhr2<sup>cre</sup>* strain is predicted to drive Cre activity in all tissues and cell types derived from the Müllerian duct mesenchyme, and phenotypic changes in the oviduct have been previously reported in conditional knockout mice using this strain (Ferguson et al., 2016; Gonzalez et Behringer, 2009; Hong, Luense, McGinnis, Nothnick et Christenson, 2008; Li et al., 2011; Nagaraja et al., 2008; Rodriguez et al., 2016). However, a formal analysis of Cre activity in the oviduct of the *Amhr2<sup>cre</sup>* model has not been previously reported. We therefore mated *Amhr2<sup>cre</sup>* mice with the CAG-tdTomato reporter strain to drive tdTomato expression in all cells expressing Cre. The resulting mice showed strong fluorescent signals in the myosalpinx and stromal cells of the isthmus (Figure 4A), indicating that the *Amhr2<sup>cre</sup>* allele targets the latter tissues. Immunohistochemistry analysis of YAP and TAZ expression in the oviducts of *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice showed a marked decrease for both proteins in the isthmus stroma and myosalpinx as early as 3 weeks of age (Figure 4B). *Yap* and *Taz* mRNA levels was also found to be decreased in isolated isthmi from 3 week-old *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* females (Figure 4C).

To characterize the cellular changes in the oviducts of *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice that could give rise to the observed phenotype, we analyzed proliferation and apoptosis by Ki-67 immunohistochemistry and TUNEL, respectively. These assays failed to detect altered proliferation or apoptosis of the oviduct stromal or smooth muscle cells in *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice at any age examined (Figure 4D, 4E and not shown). PCNA and Cleaved Caspase-3 immunohistochemistry yielded results similar to Ki-67 and TUNEL, respectively (not shown).

### **Oviductal dilations in the *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* model trap oocytes and embryos**

Further investigation of the cellular debris present in the oviduct dilations of *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice revealed spherical structures resembling oocytes (Figure 5A). An apparent blastocyst was also observed in an oviductal dilation in a female at 7.5 dpc (Figure 5B), strongly suggesting that the dilations might entrap oocytes and embryos. To test this, we mated 5 month-old *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* and control females with wild-type males. As implantation normally occurs at 4.0 dpc (Wang et Dey, 2006), females were euthanized at 6.5 dpc. The uterus of *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* contained fewer implantation sites on average than controls ( $0.4 \pm 0.4$  vs  $6.8 \pm 1.7$  respectively) ( $P < 0.0001$ ). Indeed, only one of seven *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice had implantation sites, whereas the majority of the controls (4/5) did. Multiple structures consisting of individual cells or clusters of cellular material were visible through the thinned walls of the dilated isthmi in *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice (Figure 5C). The oviducts from both groups were flushed, yielding 12 such structures on average per mouse from *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* oviducts, whereas none were retrieved in controls. Following DAPI and fluorescence microscopy analysis, these were found to consist mainly of empty zona pellucidae, degenerated oocytes and embryos, with some unhatched late blastocysts (Figure 5D). Taken together, these findings suggest that the progressive loss of fertility in *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* females was due to the development of oviductal cystic dilations that resulted in oocyte and embryo entrapment.

### **Loss of YAP/TAZ does not result in the dysregulation of biological processes known to affect oviductal wall integrity**

The oviductal dilations and myosalpinx abnormalities observed in *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* females are strikingly similar to what has been reported in mouse models harboring conditional deletions of *Tgfb1* (Li et al., 2011), *Smad1/5/4* (Rodriguez et al., 2016) and *Dicer1* (Gonzalez et Behringer, 2009; Hong et al., 2008; Nagaraja et al., 2008). Hippo has been shown to be involved in both the TGF- $\beta$ /SMAD signaling pathway (Lv et al., 2019; Varelas et al., 2008; Varelas et al., 2010) and in miRNA processing (Chaulk et al., 2014; Mori et al., 2014) in other cellular contexts. We thus investigated the possible involvement of these two processes in the development of the *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* oviduct phenotype. By immunohistochemistry, SMAD2 and p-SMAD3 expression levels and localization were found to be similar in the oviducts of 10 month-old mutant

and control animals. Signal was mainly cytoplasmic for SMAD2 and exclusively cytoplasmic for p-SMAD3 (Figure S2A and S2B). *Dicer1* mRNA levels were unchanged in the isthmus of 3 week and 2 month-old *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice (Figure 6A), as were levels of the key vascular-associated smooth muscle cell miRNA miR-143 (Cordes et al., 2009), which was previously shown to be downregulated in both the *Tgfbr1<sup>flox/bgal</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* (Li et al., 2011) and *Dicer1<sup>f/-</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* models (Nagaraja et al., 2008) (Figure 6B). Likewise, immunohistochemistry analyses showed that DICER1 and DDX17 expression levels and localization were unchanged in isthmi of 10 month-old mutant animals (Figure S2C and S2D).

Irregular myosalpinx was also reported in transgenic mice with conditionally activated *Notch1* in *Amhr2*-expressing tissues (Ferguson et al., 2016). Additionally, *Yap/Taz* deletion in neural crest precursors results in failure to produce vascular smooth muscle cells (Manderfield et al., 2015), accompanied by the downregulation of the Notch target genes *c-Myc*, *Hrt3* and *Jagged1*. We therefore evaluated their mRNA levels in isthmus lysates (together with *Cdx2* and *Notch2*, two genes regulated by Hippo (Rayon et al., 2014; Yimlamai et al., 2014)), but found their expression in *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* females to be similar to controls (Figure S3).

We also evaluated the expression of genes involved in myogenic determination of cells of the mesenchymal lineage, in addition to markers of smooth muscle cell differentiation. The mRNA levels of myogenic precursor genes *Myf5*, *Myod1* and *Myog* were unchanged in isthmi from *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice relative to controls (Figure 6C). Markers of smooth muscle cell differentiation such as *Acta2*, *Cald1*, *Cnn1*, *Des*, *Myh11*, *Smtn* and *Tagln* were likewise unaffected (Figure 6D). Finally, mRNA levels of the Hippo target genes *Cyr61*, *Ctgf*, *Nov*, *Birc5* and *-7* were evaluated in 3 week-old animals. Contrary to expectation, *Nov*, *Birc5* and *-7* expression was significantly elevated in isthmus lysates of *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* females (Figure 6E).

### 3.5 Discussion

#### **YAP and TAZ are necessary for the proper postnatal development of the myosalpinx**

Although a recent study showed that conditional deletion of *Lats1* and *-2* in the Müllerian mesenchyme resulted in cell fate decision defects apparently due to increased expression of YAP

and TAZ and their target genes (St-Jean, Tsoi, et al., 2019), the roles of YAP and TAZ in the physiological context of female reproductive tract development and function remained unclear. Here, we show that conditional inactivation of *Yap* and *Taz* in the oviduct results in disorderly development of the myosalpinx of the isthmus after the age of three weeks, suggesting their involvement in some aspect of oviduct smooth muscle cell biology. Roles for the Hippo pathway in smooth muscle cells have been previously reported. For instance, the inactivation of Hippo either by pharmacological inhibition or by siRNA has been shown to decrease proliferation in cultured airway (Fu, Zheng, et al., 2017; Liu et al., 2018) and intestinal (Dai et al., 2018) smooth muscle cells. In a model of cultured rat carotid vascular smooth muscle cells, injury resulted in increased TEAD transcriptional activity, higher YAP and CTGF levels and enhanced proliferation (Chen et Liu, 2018). Likewise, the YAP/TAZ transcriptional target genes *Cyr61*, *Ctgf* and *Nov* have been shown to be involved in vascular smooth muscle cell proliferation (Hwang, Nam et Kang, 2018; Lee et al., 2007; Shimoyama et al., 2010). However, we failed to detect any differences in smooth muscle cell proliferation in the oviducts of *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice, and our analyses of YAP/TAZ target gene expression did not show decreases in mRNA levels of *Cyr61*, *Ctgf* or *Nov*. Furthermore, expression of smooth muscle cell markers seemed to indicate that smooth muscle cell differentiation and overall numbers of cells were unchanged, and we could not find evidence of increased apoptosis within the myosalpinx. The cellular mechanism underlying the formation of the discontinuities in the myosalpinx therefore remains unclear. One possibility is that YAP/TAZ are involved in regulating smooth muscle cell migration or cell-cell adhesion, as has been shown in other cell types (Chen et Liu, 2018; Fu, Zheng, et al., 2017; Nardone et al., 2017), and that defects in these processes cause gaps to form in the myosalpinx, and/or result in an oviduct wall of inadequate tensile strength. Further experiments will be required to test these hypotheses.

### **Loss of YAP and TAZ resulted in the development of oviductal dilations which prevented adequate embryo transport**

Lower levels of *Yap* and *Taz* mRNA and protein levels were first observed in the oviducts of 3 week-old *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice, and led to the later formation of myosalpinx defects by two months of age. Though difficult to prove beyond doubt, the oviductal dilations appeared to

originate from these defects, which were presumed to be structural weak points in the oviduct wall. Intraluminal pressure and the movement of oviductal fluid provide a likely explanation for the progressive increase in the volume of these dilations with age. The fact that the myosalpinx represents a proportionally greater structural component of the wall of the isthmus in comparison with the ampulla may explain why the dilations were always located at the isthmus.

In mice, embryos enter the uterine lumen around the late morula stage at 3.5 dpc (Wang et Dey, 2006). The presence of blastocysts in the oviducts of the *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* model at 6.5 dpc was thus highly abnormal. The mouse uterus is refractory to implantation from 5.5 dpc onwards (Wang et Dey, 2006). Considering the tight window of opportunity for implantation in mice, even a slightly delayed uterine entry would presumably result in a failure to implant. This idea, combined with the near absence of implantation sites observed in 5 month-old *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* at 6.5 dpc, clearly shows that the development of oviductal dilations is responsible for the subfertility observed in this model. This is also concordant with the fertility assay, which showed that fertility is not impaired in the first few litters, but rather decreases dramatically with age, in parallel with the formation and growth of the oviduct dilations.

Transport of embryos through the oviductal lumen is driven by the beating of the cilia of the epithelial cells and by rhythmic contractions of the myosalpinx (mainly in the ampulla and in the isthmus, respectively). Using a calcium channel antagonist to paralyze the myosalpinx, Dixon *et al.* demonstrated that oviduct cilia beating alone is not sufficient to propel oocytes through the oviductal lumen (Dixon et al., 2009). We therefore postulate that disruption of the integrity of the oviduct wall in the *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* model causes subfertility by entrapping embryos in cystic dilations, but also by preventing effective contractions of the isthmus myosalpinx, thereby resulting in inadequate transport of embryos toward the uterus. Retrograde sperm transport did not seem to be fully hindered, given the presence of fertilized embryos within the dilations.

### **Poor recombination efficiency in the *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* model**

The *Amhr2<sup>cre</sup>* model has been shown to direct efficient recombination in Müllerian mesenchyme cells as early as e14.5 (Jamin et al., 2002), and ovarian granulosa cells from the secondary follicle stage onward (Jorgez et al., 2004). Why Cre-mediated inactivation of *Yap* and

*Taz* was inefficient in the ovary and uterus and only occurred to an appreciable extent in the oviduct of the *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* model remains unknown. Importantly, our study does not preclude roles for *Yap* and *Taz* during Müllerian duct and uterine development or in ovarian physiology. However, more efficient Cre models and/or *Yap/Taz* floxed alleles will likely have to be developed in order to address these questions by conditional gene targeting. Likewise, even within the oviduct, *Yap/Taz* inactivation was not complete in the *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* model, and perhaps earlier or more marked phenotypic changes would have arisen had this process been more efficient.

### **The molecular mechanisms underlying *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* oviduct defects are distinct from models with similar phenotypic changes**

The oviductal dilation and myosalpinx development defects that occur in *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* females strikingly resemble those of previously reported mouse models of conditional deletion of *Tgfbr1* (Li et al., 2011), *Smad1/5/4* (Rodriguez et al., 2016) and *Dicer1* (Gonzalez et Behringer, 2009; Hong et al., 2008; Nagaraja et al., 2008). This seemed particularly pertinent given that Hippo had previously been shown to interact with the TGF- $\beta$ /SMAD pathway and to affect miRNA processing in certain cell types. For instance, in mouse granulosa cells, *Yap* knockdown resulted in the alteration of TGF $\beta$ 1-induced phosphorylation of SMAD2 and SMAD3, along with downregulation of *Tgfbr1* (Lv et al., 2019). YAP and TAZ have also been shown to be involved in the control of the subcellular localization of phosphorylated receptor-regulated SMADs (Varelas et al., 2008; Varelas et al., 2010). Chaulk *et al.* showed that nuclear YAP/TAZ are required to maintain high DICER1 levels and for pre-miRNA processing in human mammary gland cells (Chaulk et al., 2014). Furthermore, high levels of YAP can suppress miRNA synthesis by limiting the association of the Microprocessor with its cofactor DDX17 (Mori et al., 2014). These previous studies therefore directed our mechanistic investigations of the *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* phenotype toward TGF- $\beta$ /SMAD signaling and miRNA synthesis. However, we were unable to detect the dysregulation of either of these processes in the *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* model.

Ferguson *et al.* reported that oviducts of transgenic mice with conditionally activated *Notch1* in *Amhr2*-expressing tissues consisted entirely of small cysts, and that the myosalpinx was

irregular (Ferguson et al., 2016). Considering that *Yap/Taz* deletion in neural crest precursors results in the downregulation of Notch target genes and failure to produce smooth muscle cells (Manderfield et al., 2015), we investigated possible misregulation of the Notch pathway in the development of the *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* oviductal phenotype, but failed to find any evidence of this. The molecular mechanisms underlying the development of oviduct defects in the *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* model therefore remain to be determined, but appear not to involve alterations in TGF- $\beta$ /SMAD or Notch signaling, miRNA biogenesis or loss of expression of smooth muscle cell markers or well-characterized YAP/TAZ transcriptional target genes.

In conclusion, this is the first report demonstrating a role of the Hippo pathway in oviductal smooth muscle cells. YAP and TAZ were found to be necessary for the maintenance of oviduct integrity, adequate embryo transport and fertility in aging female mice. Future studies would be required to better define the mechanism by which YAP and TAZ regulate oviductal smooth muscle cell physiology and how they might be involved in the development of other tissues derived from the Müllerian ducts.

### 3.6 Remerciements

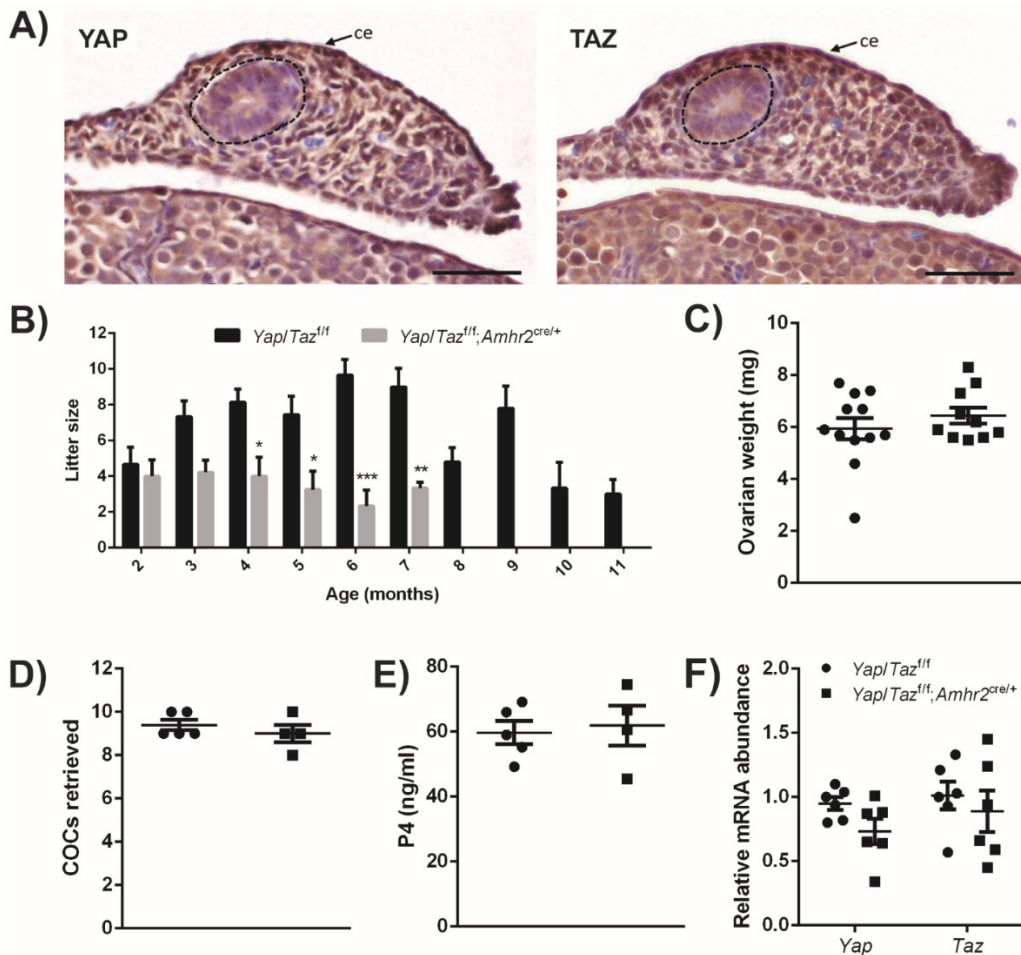
The authors thank Claude Paquet, Jacinthe Cardin and Meggie Girard (all from Université de Montréal) for technical support. The authors thank Eric Olson (UT Southwestern Medical Center) and Richard R. Behringer (M.D. Anderson Cancer Center) for generously providing *Yap<sup>f/f</sup>*, *Taz<sup>f/f</sup>* and *Amhr2<sup>cre</sup>* mice.

### 3.7 Financement

This work was supported by a project grant of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to DB (MOP-142445). PG was supported by a doctoral training research award from the Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS). The University of Virginia Center for Research in Reproduction Ligand Assay and Analysis Core is supported by the Eunice Kennedy Shriver NICHD/NIH (NCTRI) Grant P50-HD28934.

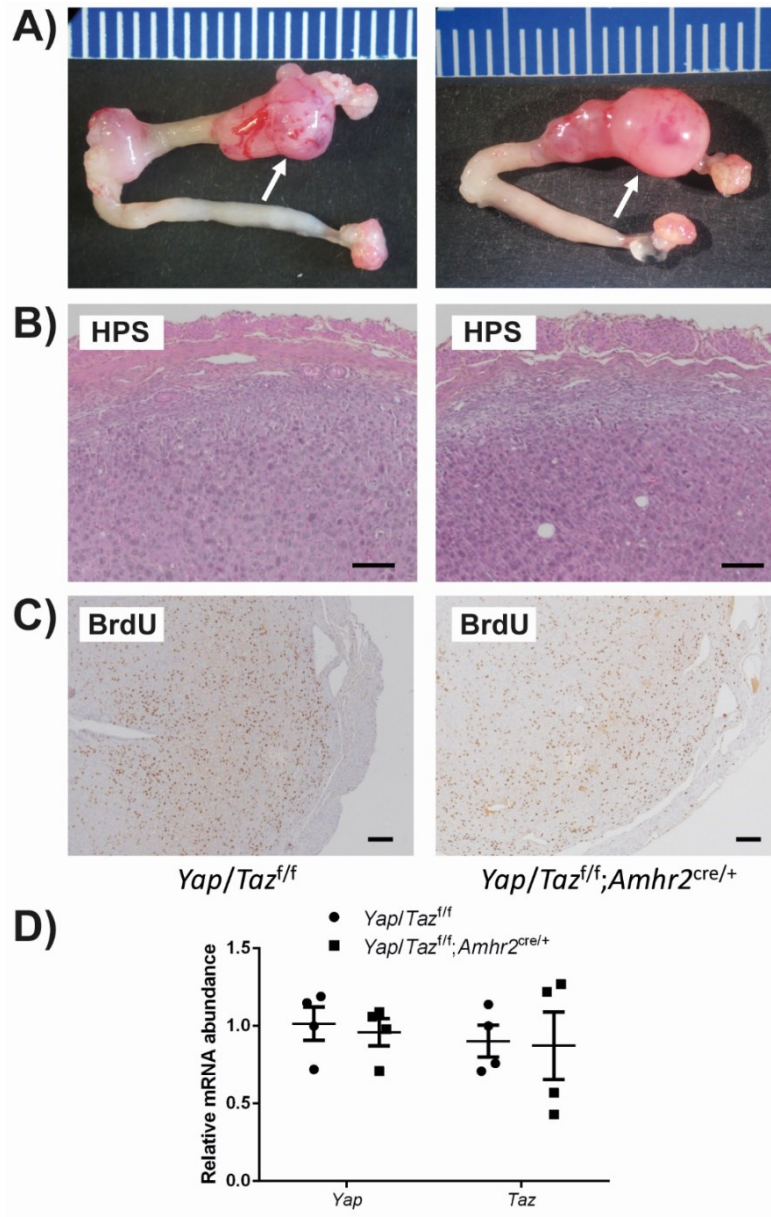


### 3.8 Figures



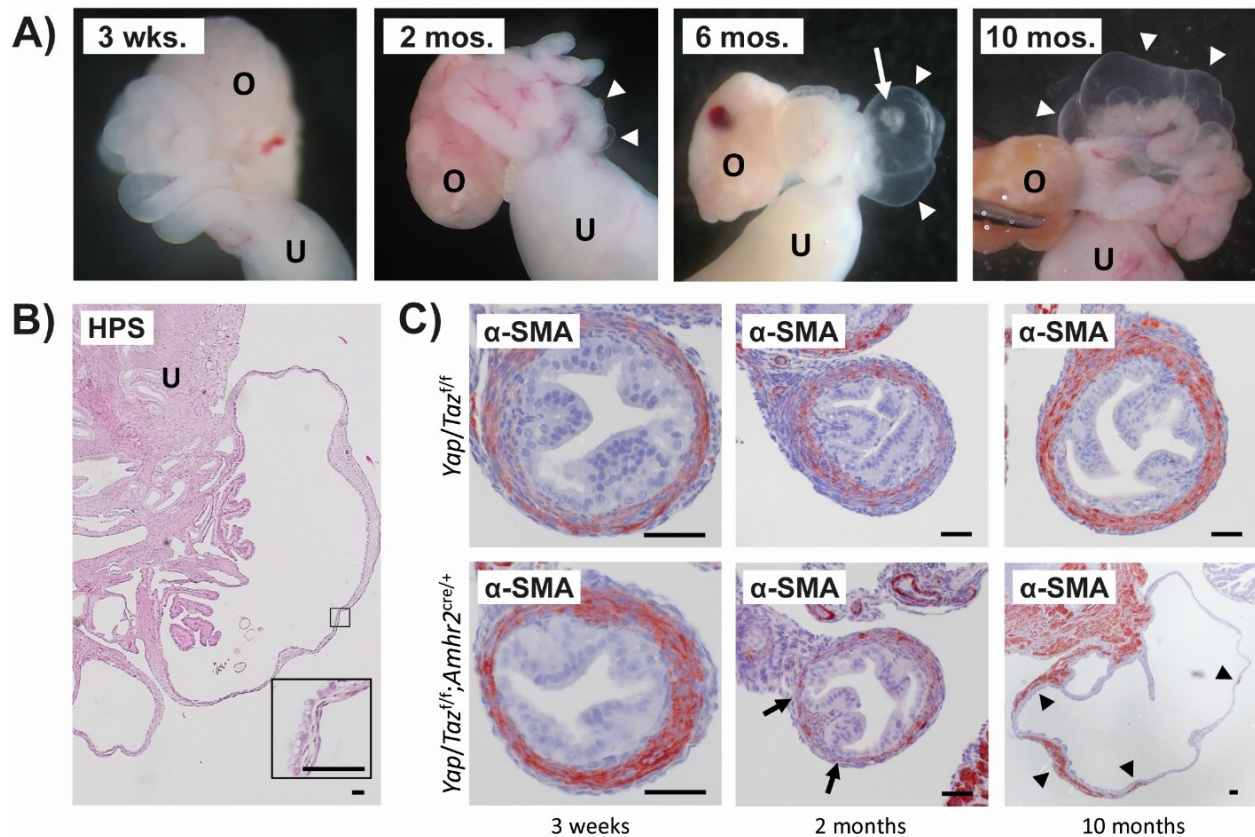
**Figure 1.** – Müllerian ducts express YAP and TAZ and fertility of *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* females decreases with age in an ovary-independent manner

(A) Immunohistochemistry analyses of YAP and TAZ on Müllerian ducts of E17.5 wild-type female mice. Dash lines separate the Müllerian duct epithelium and mesenchyme. ce = coelomic epithelium. Scale bars are 50  $\mu\text{m}$ . (B) Fertility of *Yap/Taz<sup>f/f</sup>* and *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* females throughout a 10-month long trial. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001. (C) Ovarian weights of 10 month-old mice (n=6 females/genotype). (D) Ovulation rate of 5 month-old *Yap/Taz<sup>f/f</sup>* and *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice (n=5 and 4). (E) Progesterone serum levels in 7.5 dpc 2 month-old control and experimental females (n=5 and 4). (F) RT-qPCR analyses of Yap and Taz mRNA levels in granulosa cells of 3 week-old *Yap/Taz<sup>f/f</sup>* and *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice. Data are means  $\pm$  SEM.



**Figure 2.** – *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* uterus is unaffected

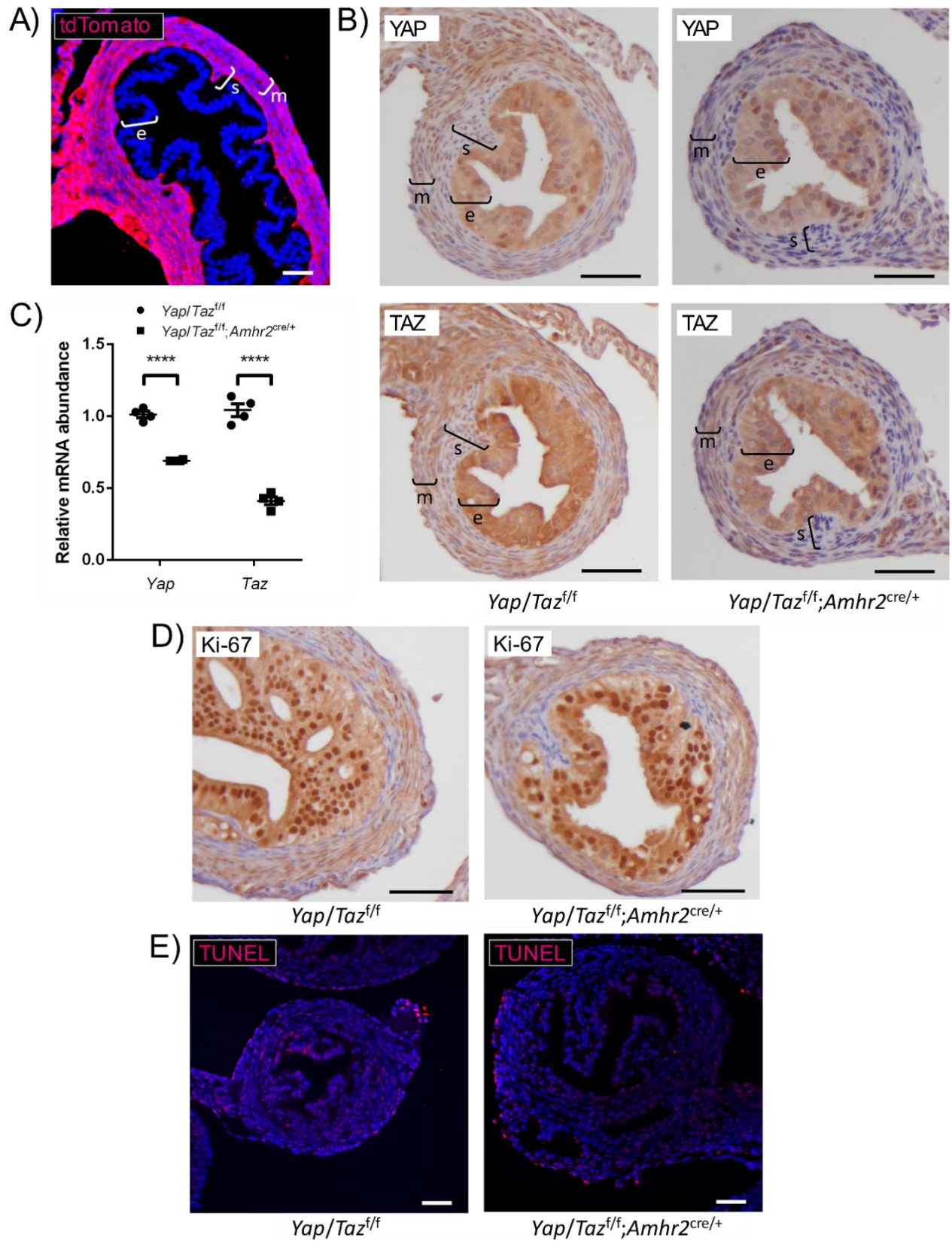
(A) Photomicrographs of artificially decidualized uteri of 3 month-old *Yap/Taz<sup>f/f</sup>* and *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice. Arrows indicate decidualized regions of the injected horns. Representative images of staining with hematoxylin phloxine saffron (HPS) (B) and BrdU incorporation assays (C) of uteri of pregnant 3 month-old females at 7.5 dpc. (D) RT-qPCR analyses of *Yap* and *Taz* mRNA levels in whole uterine lysates of 2 month-old *Yap/Taz<sup>f/f</sup>* and *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice. Ruler graduations are in millimeters. Scale bars are 100  $\mu$ m. Data are means  $\pm$  SEM, n=4 animals/genotype.



**Figure 3.** – *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice develop oviductal dilations concomitant with myosalpinx thinning

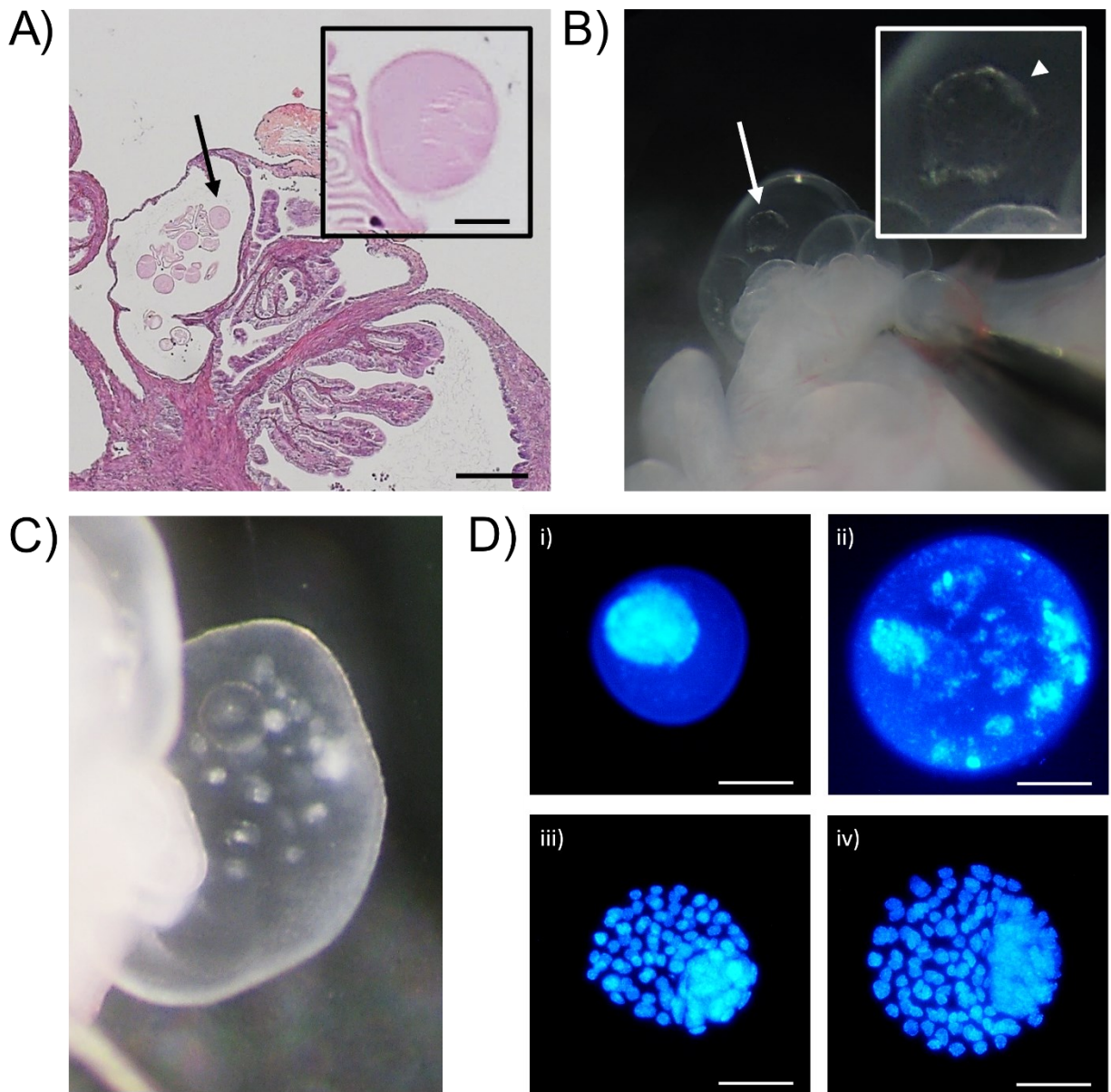
(A) Representative photomicrographs displaying the evolution of the oviductal phenotype with increasing age in *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice. Arrowheads indicate dilations of the isthmus wall. Cellular debris are indicated by an arrow. (B) Oviductal dilation in a 10 month-old *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* female. Inset shows the thin oviductal wall characterized by a cuboidal epithelium on a thin stroma. Stain = hematoxylin phloxine saffron (HPS). (C) α-SMA immunohistochemistry analyses of 3 week-, 2 and 10 month-old isthmus sections. Arrows indicate discontinuities in the myosalpinx of a 2 month-old *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mouse. Myosalpinx remnants in a 10 month-old *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mouse are indicated by arrowheads. O = ovary. U = uterine horn. Scale bars are 50 μm.





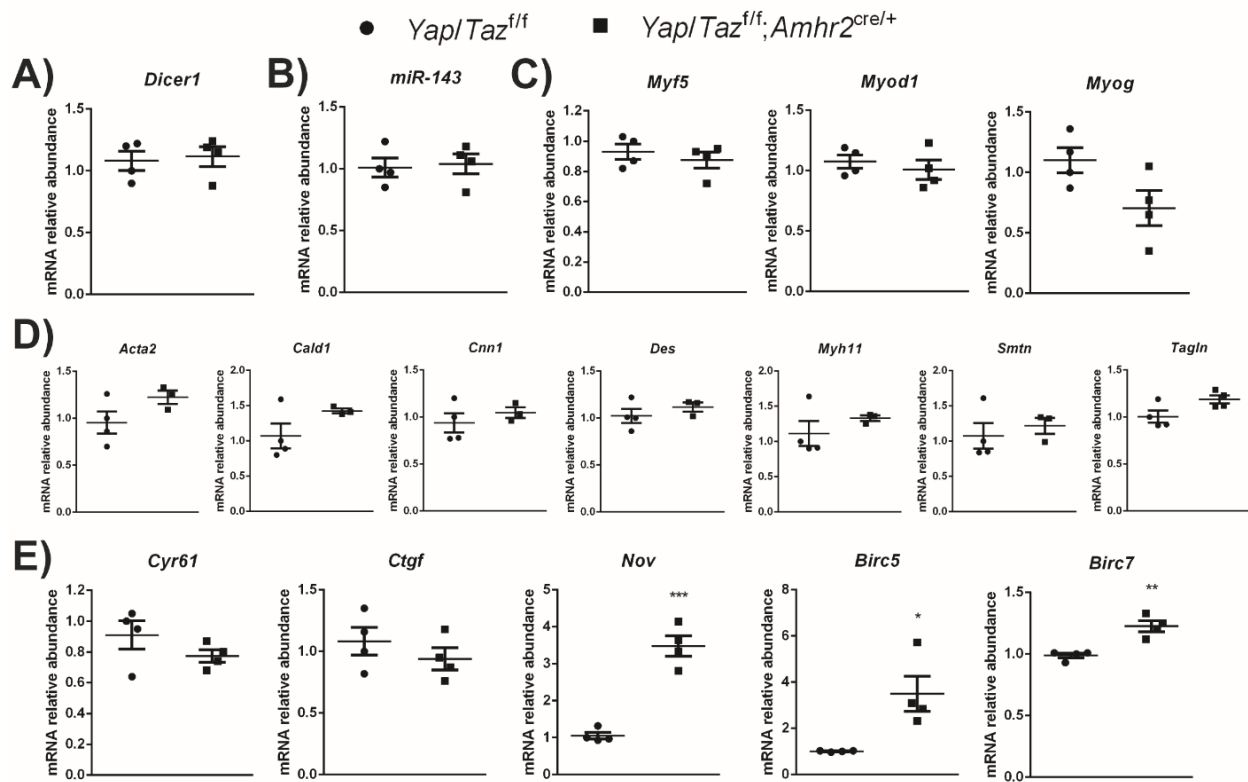
**Figure 4.** – Loss of YAP and TAZ in the stroma and myosalpinx of *Yap/Taz<sup>ff/ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice does not affect proliferation or apoptosis

(A) Fluorescence image showing the expression of td Tomato in the stroma and myosalpinx of the isthmus of a CAG-tdTomato;*Amhr2<sup>cre/+</sup>* mouse. Immunohistochemistry (B) and RT-qPCR (C) analyses of *Yap* and *Taz* expression in the isthmus of 3 week-old *Yap/Taz<sup>ff/ff</sup>* and *Yap/Taz<sup>ff/ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice. Immunohistochemistry analyses of Ki-67 (D) and fluorescence images of TUNEL assay (E) of isthmus sections of 2 month-old animals of the indicated genotypes. Scale bars are 50  $\mu$ m. Data are means  $\pm$  SEM analyzed by Student's *t*-tests, n=4. \*\*\*\*P < 0.0001.



**Figure 5. –** Oviductal dilations result in oocyte and embryo entrapment

(A) Oviductal dilation of a *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* containing oocytes (arrow). Inset shows a higher magnification. Stain = hematoxylin phloxine saffron (HPS). (B) Photomicrograph showing a blastocyst (arrow) in an oviductal dilation of a *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* female 7.5 dpc. Inset shows a higher magnification. Arrowhead indicates the ICM. (C) Photomicrograph of an oviductal dilation containing debris including degenerated oocytes and embryos. (D) Fluorescent images of DAPI-stained unfertilized oocyte (i), degenerated embryo (ii) and 6.5 dpc unhatched blastocysts (iii, iv) retrieved by oviductal flushing. Scale bars are 200  $\mu\text{m}$  (A), 25  $\mu\text{m}$  (A - inset) and 50  $\mu\text{m}$  (D).

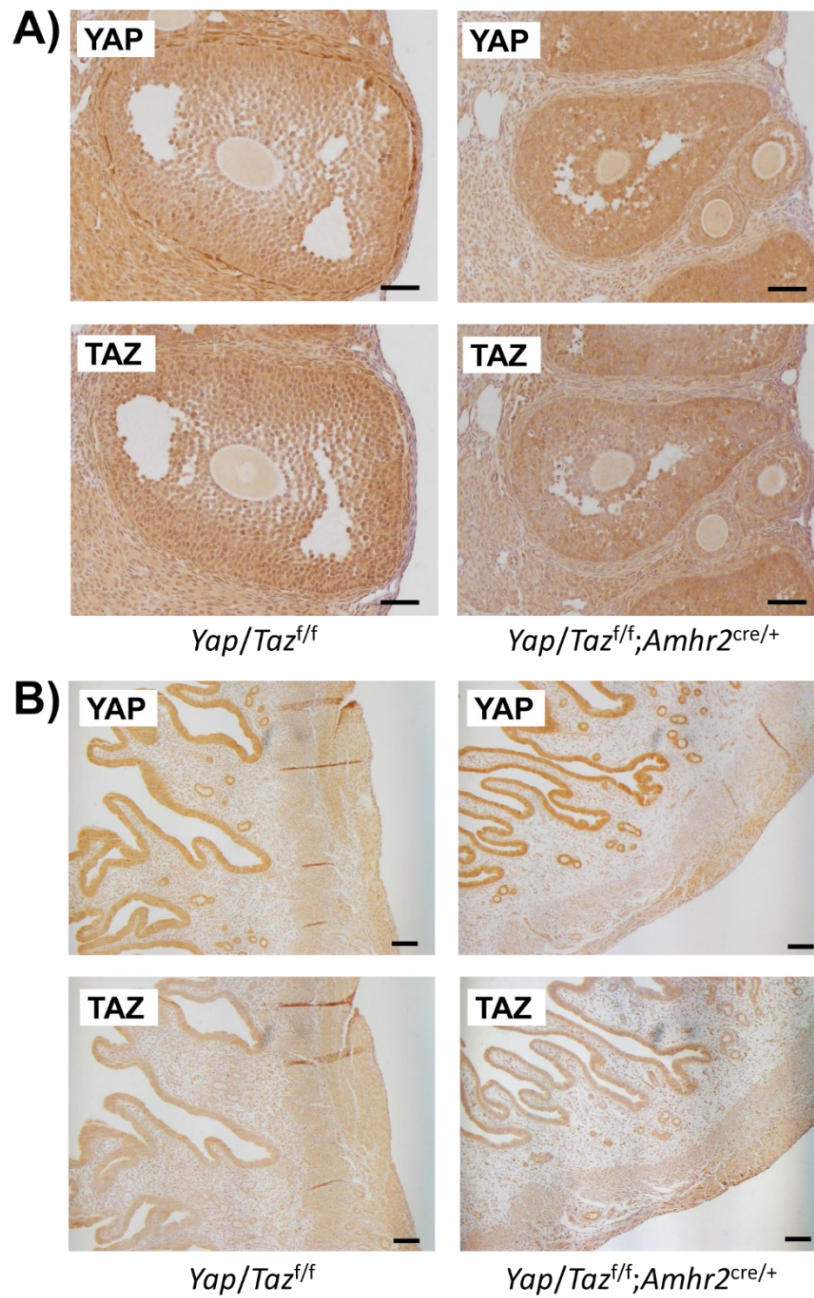


**Figure 6.** – mRNA expression in *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* isthmi is only moderately affected

RT-qPCR analyses of isthmus lysates of 3 week-old *Yap/Taz<sup>f/f</sup>* and *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* females for *Dicer1* (A), *miR-143* (B), myogenic precursors *Myf5*, *Myod1* and *Myog* (C), markers of smooth muscle cell differentiation *Acta2*, *Cald1*, *Cnn1*, *Des*, *Myh11*, *Smtn* and *Tagln* (D) and Hippo target genes *Cyr61*, *Ctgf*, *Nov*, *Birc5* and -7 (E). Data are means  $\pm$  SEM analyzed by Student's *t*-tests,  $n=4$ . \* $P < 0.05$ . \*\* $P < 0.01$ . \*\*\* $P < 0,001$ .



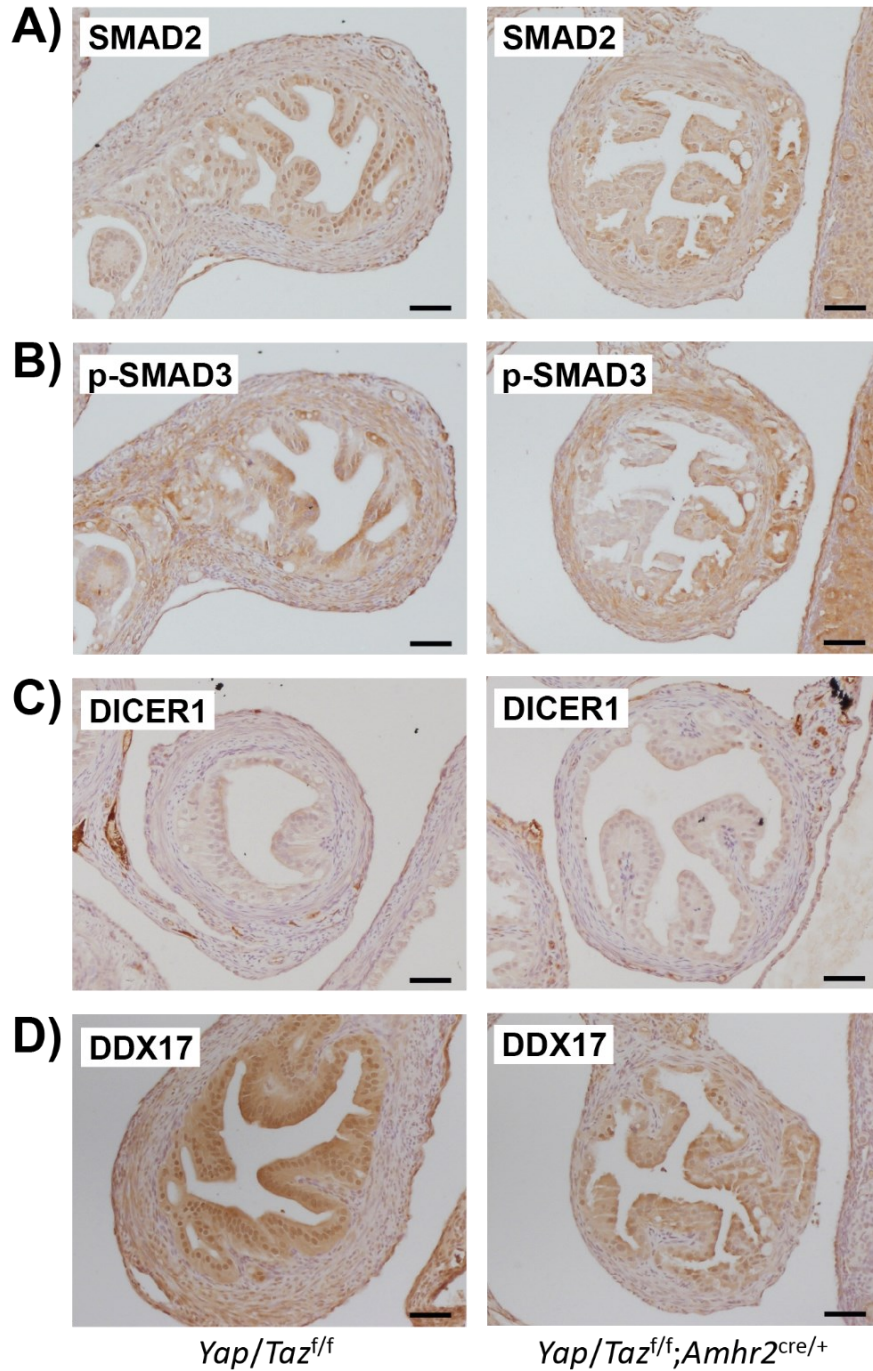
### 3.9 Figures supplémentaires



**Figure S1.** – The *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* model has poor recombination efficiency in its ovaries and uterus

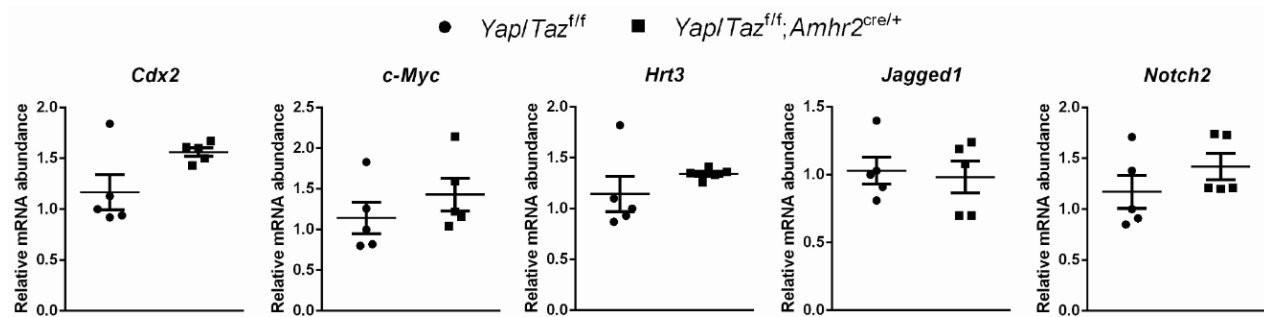
Immunohistochemical analyses of YAP and TAZ expression in antral follicles (A) and uterus (B) of 10 month-old *Yap/Taz<sup>f/f</sup>* and *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* females. Scale bars are 100  $\mu$ m.





**Figure S2.** – Loss of YAP/TAZ does not result in the dysregulation of the TGF- $\beta$ /SMAD pathway or the biogenesis of miRNAs

Immunohistochemical analyses of SMAD2 (A), p-SMAD3 (B), DICER1 (C) and DDX17 (D) expression in the isthmus of 10 month-old *Yap/Taz<sup>f/f</sup>* and *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* females. Scale bars are 100  $\mu$ m.



**Figure S3.** – mRNA expression of Notch-related genes in *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* isthmi is not altered

RT-qPCR analyses of *Cdx2*, *c-Myc*, *Hrt3*, *Jagged1* and *Notch2* mRNA levels in isthmus lysates of 2 month-old *Yap/Taz<sup>f/f</sup>* and *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* females. Data are means ± SEM.

### 3.10 Tableau

**Tableau 1.** – Fertility of *Yap/Taz<sup>f/f</sup>* and *Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* female mice

	<i>Yap/Taz<sup>f/f</sup></i>	<i>Yap/Taz<sup>f/f</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup></i>
Number of females	6	7
Number of litters	58	26
Total number of pups	402	110
Litter size	6.9 ± 0.4	4.2 ± 0.4***
Litter/month	1.1 ± 0.1	0.4 ± 0.1***

\*\*\*P < 0.001

### 3.11 Tableaux supplémentaires

**Tableau S1.** – List of qPCR primer pairs used

<b>Primer</b>	<b>Forward sequence (5' to 3')</b>	<b>Reverse sequence (5' to 3')</b>
Acta2	AGCCATCTTTCATTGGGATGG	CCCCTGACAGGACGTTGTTA
Birc5	TCATCCACTGCCCTACCGAG	CAGGGGAGTGCTTTCTATGCT
Birc7	TCTCCATAGTCTTCGTGCC	AGGAATGTGCGTACACAGCTA
Cald1	GTTGCTGCCCTAGAGATAGTCA	AACCTTTGACTGTCCACCCC
Cdx2	TCAACCTCGCCACAACCTTCCC	TGGCTCAGCCTGGGATTGCT
cMyc	CTGTTTGAAGGCTGGATTTCT	CAGCACCGACAGACGCC
Cnn1	TGCGCTTGTCTGTGTCATCT	TCTGGGCCAGCTTGTTCTTT
Ctgf	GAGGAAAACATTAAGAAGGGCAAAA	CCGCAGAACTTAGCCCTGTA
Cyr61	TTGACCAGACTGGCGCTCT	AGTTTTGCTGCAGTCCTCGT
Des	AGGCTCAAGGCCAAACTACA	TCTGCGCTCCAGGTCAATAC
Dicer1	TGCTGCAGTAAGCTGTGCTA	GACCCATTGGTGAGGAAGCA
Hrt3	TTCAGAAAAGTGGAACAGAGGGC	CCAATCAGGATGGATGCTCAAAG
Jagged1	GCTTCCACTGGCACTGGTAGTTTC	TGCTGACATCAAATCCCCCTC
Myf5	GACGGCATGCCTGAATGTAAC	CCGATCCACAATGCTGGACA
Myh11	CACAAGGGCAAGAAAGACAGC	AACTTGCCAAAGCGAGAGGA
Myod1	CTGCTCTGATGGCATGATGGA	CACTGTAGTAGGCGGTGTCG
Myog	GTGCCAGTGAATGCAACTC	CGAGCAAATGATCTCCTGGGT
Notch2	GCCTCGGAAAGAATAACAGCAG	AAAGGTGGAGGCAGGAGAAGTA
Nov	AGAGTTGTTCTGAGATGAGACCC	CCCTCTGGAACCATGCAAATG
Rpl19	ACTGGCCAGAGATACTTCCTTAATC	GGACAGAGTCTTGATGATCTC
Smtn	TTGTGTGGGGCTTAGTCAGG	GGTGGCACTCAGAATTCAAACC
Tagln	GCCTTTAAACCCCTCACCCAG	CATGTTGAGGCAGAGAAGGCTTG
Taz	CATGGCAAACGAGGGTCC	AGGCTGATTCATCACCTTCCTG
Yap	GACGCTGATGAATTCTGCCTCA	CATGGCAAACGAGGGTCC

**Chapitre 4 – La voie Hippo dans l’ovulation  
(Second article)**

# The Granulosa Cell Response to Luteinizing Hormone is Partly Mediated by YAP1-Dependent Induction of Amphiregulin

Philippe Godin<sup>1</sup>, Mayra F Tsoi<sup>1</sup>, Martin Morin<sup>2</sup>, Nicolas Gévry<sup>2</sup> et Derek Boerboom<sup>1</sup>

Affiliations :

<sup>1</sup>Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, J2S 2M2, QC, Canada et <sup>2</sup>Département de Biologie, Université de Sherbrooke, 2500 de l'Université, Sherbrooke, J1K 2R1, QC, Canada.

Auteur de correspondance : [derek.boerboom@umontreal.ca](mailto:derek.boerboom@umontreal.ca)

Mots-clés : Yap1, Hippo pathway, amphiregulin, luteinizing hormone, granulosa cells, ovulation

Publication acceptée par la revue *Cell Communication and Signaling* en février 2022.

Contribution des auteurs :

PG, MFT et DB ont établi le design expérimental global. MM et NG ont contribué au design et à l'interprétation de l'expérience d'immunoprécipitation de la chromatine. PG et MFT ont récolté les données. PG a analysé les résultats générés. PG, MFT et DB ont interprété les résultats. PG a rédigé la première version du manuscrit et en a effectué les corrections. DB a révisé la version préliminaire du manuscrit. Tous les co-auteurs ont révisé la forme finale du manuscrit.

## 4.1 Résumé

The LH surge is a pivotal event that triggers multiple key ovarian processes including oocyte maturation, cumulus expansion, follicular wall rupture and luteinization of mural granulosa and theca cells. Recently, LH-dependent activation of the Hippo signaling pathway has been shown to be required for the differentiation of granulosa cells into luteal cells. This study aimed to better characterize the roles of the Hippo pathway in the LH response in murine granulosa cells. Granulosa cells treated with LH in vitro or collected from immature mice treated with equine chorionic gonadotropin (eCG) and human chorionic gonadotropin (hCG) showed a transient increase in phospho-LATS1(Thr1079), phospho-YAP1(Ser127 and Ser397) and phospho-TAZ(Ser89) levels. Pharmacologic inhibition revealed that Hippo activation by LH is PKA-dependent. Knockdown of *Yap1/Taz* blunted the induction of several LH targets such as *Areg*, *Pgr* and *Ptgs2* and blocked the activation of the ERK1/2 pathway. Microarray analyses revealed substantial overlap between genes that are upregulated by LH and those that are downregulated following loss of *Yap1/Taz*, suggesting a major role for Hippo in mediating LH action. Of these YAP1/TAZ-regulated genes, many were related to biological processes that regulate ovulation. Using ChIP-qPCR analyses, we found a marked recruitment of YAP1 to the *Areg* promoter of granulosa cells after 60 minutes of hCG stimulation. Overall, these results indicate that Hippo collaborates with the cAMP/PKA and ERK1/2 pathways to participate in the precise regulation of the LH cascade, and that *Areg*, as a direct transcriptional target of YAP1, is involved in mediating its actions in the ovary.

## 4.2 Introduction

In the cycling mammalian female, folliculogenesis culminates with a luteinizing hormone (LH) surge that triggers ovulation. This singular event is a pivotal point for the fate of most ovarian cells, as it leads to resumption of oocyte meiosis, cumulus expansion, follicular wall rupture and luteinization of mural granulosa cells (GCs) and theca cells. Failure in any of these processes can lead to ovulation defects, which prevent fertilization and impair female reproductive success. Binding of LH to its G-protein-coupled receptor (LHCGR) results in an increase in intracellular

levels of cAMP, leading to the activation of PKA and CREB. Although they respond to the LH surge, the oocyte and cumulus cells do not express *Lhcgr*. Instead, key components of the epidermal growth factor (EGF) family, notably amphiregulin (*Areg*), epiregulin (*Ereg*) and betacellulin (*Btc*), secreted by mural GCs following PKA-dependent CREB phosphorylation, mediate the paracrine transmission of the LH signal (Rimon-Dahari et al., 2016; Robker et al., 2018). Subsequent EGF receptor (EGFR) activation leads to sustained activation of the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2, also known as mitogen-activated protein kinases 3 and 1 [MAPK3/1]) (Panigone et al., 2008), which is essential for LH-induced oocyte maturation, cumulus expansion and luteinization (Fan et al., 2009; Norris et al., 2008; Park et al., 2004). Even though the involvement of the PKA/CREB, EGFR and ERK1/2 pathways in the LH cascade has long been recognized, the precise mechanisms of LH action in GCs remain incompletely understood.

The Hippo pathway is a master regulator of cell proliferation and differentiation in a wide variety of cell types. It is an evolutionarily conserved signaling pathway well-known for its central role in embryo development, organ size determination and carcinogenesis. Activation of the canonical Hippo pathway by various upstream signals ultimately results in the phosphorylation of yes-associated protein 1 (YAP1, at serine residues S127 and S397) and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ, at S89) by large tumor suppressor kinases 1 and -2 (LATS1/2) (Piccolo et al., 2014). Phosphorylation at these serine residues promotes the cytoplasmic retention and/or ubiquitin-dependent degradation of YAP1/TAZ (Lei et al., 2008; Liu, Zha, et al., 2010; Zhao et al., 2010; Zhao et al., 2007), which prevents their binding to transcription factors located in the cell nucleus (notably those of the TEAD and RUNX families (Piccolo et al., 2014)), and thereby prevents the transcription of Hippo target genes (Meng et al., 2016). Notable YAP1/TAZ transcriptional target genes include members of the CCN family of matricellular proteins (*Ccn1, 2, 3, 5, 6*), members of the baculoviral inhibitors of apoptosis repeat containing (*Birc5, 7*) family and EGF family member *Areg* (Piccolo et al., 2014).

Although early research on Hippo signaling was mainly focused on organ and tumor development, its roles in the physiology of normal adult tissues have been gaining increased attention. In the ovary, inactivation of the Hippo pathway has been shown to be required for GC proliferation. Ovarian fragmentation leads to a YAP1-dependent activation of follicular

development (Kawamura et al., 2013). In human GC tumor cells and in bovine GCs, loss of *Yap1* and/or *Taz* expression negatively affects proliferation and steroidogenesis (Fu et al., 2014; Plewes et al., 2019). Likewise, conditional inactivation of *Yap1* in GCs at all stages of folliculogenesis in mice resulted in fewer corpora lutea and reduced fertility (Lv et al., 2019). Recent reports have also suggested that Hippo is activated in GCs in response to the LH surge. Following the ovulatory signal, YAP1 is quickly phosphorylated and exported from the nucleus of GCs (Ji et al., 2017; Lv et al., 2019; Sun et Diaz, 2019). In addition, YAP1 overexpression in GCs has been shown to prevent adequate induction of LH target genes (Ji et al., 2017) and progesterone production (Lv et al., 2019). The Hippo pathway therefore appears to be a negative regulator of follicle growth, but its activation by LH may be required for LH to exert its effects during terminal follicle differentiation.

As *Areg* has been shown to be a direct transcriptional target of Hippo in human epithelial breast (Zhang et al., 2009) and keratinocyte (Kim et al., 2020) cell lines, in this study, we investigated the interactions between the Hippo pathway and the LH signaling cascade, with emphasis on the potential regulation of *Areg* by Hippo in GCs. Here we show that Hippo activation following the ovulatory signal is a PKA-dependent process. Knockdown of *Yap1* and *Taz* expression in primary cultures of GCs demonstrates their requirement for the induction of several genes involved in biological processes related to ovulation. Finally, we report for the first time the direct transcriptional regulation of *Areg* by the Hippo pathway in murine GCs.

## 4.3 Matériel et méthodes

### ANIMAL MODELS, OVARY COLLECTION and GC ISOLATION

C57BL/6J wild-type (WT) mice were purchased from The Jackson Laboratory. Mice bearing floxed alleles for *Yap1* and/or *Taz* (referred to as *Yap1<sup>f/f</sup>*, *Taz<sup>f/f</sup>* and *Yap1<sup>f/f</sup>;Taz<sup>f/f</sup>*) were graciously provided by Eric Olson (University of Texas Southwestern Medical Center). Genotyping analyses were performed on DNA extracted from tail biopsies as previously described (Godin et al., 2020; Xin et al., 2013; Xin et al., 2011). Immature (22- to 25-day old) female mice were treated with 5IU of equine chorionic gonadotropin IP (eCG; Intervet Canada Corp.), followed or not 48 hours (h) later by an ovulatory dose of 5IU of human chorionic gonadotropin IP (hCG; Intervet Canada



Corp.). Whole ovaries obtained 48h after eCG and 4h after hCG were fixed in 10% formalin for immunohistochemical analyses. Ovaries collected 48h after eCG and 1, 4, 8 or 12h after hCG were placed in HBSS, and their follicles were punctured using 26-gauge needles to release GCs. Cells were then centrifuged (2000g, 10 min) without any additional filtration step, HBSS was removed, and GCs were flash frozen for immunoblotting (n=4 mice/time point) or real-time PCR (RT-qPCR) (n=4 mice/time point, done three times), or cross-linked for chromatin immunoprecipitation (ChIP) analyses (n=4 biological replicates/time point, one replicate represents the GCs of 4 mice), as described below.

## CELL CULTURE

Isolated GCs from eCG-stimulated immature WT mouse ovaries were seeded onto 96-well plates (ThermoFisher Scientific) at a density of 0.5 ovaries per well in MEM 1X (ThermoFisher Scientific) supplemented with 0.25mM sodium pyruvate (ThermoFisher Scientific), 3mM L-glutamine (Wisent Inc.), penicillin-streptomycin (Wisent Inc.) and 1% fetal bovine serum (FBS; Wisent Inc.) for 3h at 37°C. Cells were serum starved for 2h before treatment with 50ng/ml human recombinant LH (National Hormone & Peptide Program) or PBS (control) for 5, 15, 30 or 60 minutes (min). Alternatively, cells were pretreated with inhibitors against PKA (H-89; 10µM for 30 min; Tocris and PKA inhibitor 14-22 amide [PKI]; 50µM for 30 min; MilliporeSigma), AKT1/2/3 (MK-2206; 10µM for 60 min; Selleckchem) or MEK1/2 (U0126; 10µM for 60 min; Selleckchem) prior to treatment with LH for 30 min. Isolated GCs from *Yap1<sup>f/f</sup>*, *Taz<sup>f/f</sup>* and *Yap1<sup>f/f</sup>;Taz<sup>f/f</sup>* eCG-primed immature mice were seeded onto 96-well plates (0.5 ovaries/well) as described above, but supplemented with 2% FBS for 4h before infection with either Ad5-CMV-eGFP (Ad-eGFP; eGFP control adenovirus; Vector Biolabs) or Ad5-Cre-eGFP (Ad-Cre; Cre recombinase adenovirus; Vector Biolabs) for 18 or 24h in 2% FBS using a multiplicity of infection of 50. After infection, cells were serum starved for 2h prior to treatment with LH for 30 min, 1, 2 or 6 h or with 10µM forskolin (FSK; Selleckchem) for 2h. For all the experiments described above, cells were harvested for subsequent immunoblotting, RT-qPCR or microarray analyses.

## IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Immunohistochemical (IHC) analyses were performed on formalin fixed, paraffin-embedded, 3µm thick ovarian sections. Following deparaffinization, rehydration and sodium

citrate heat-mediated antigen retrieval, sections were incubated with Phospho-LATS1(Thr1079) or Phospho-YAP1(S127) antibodies at a 1:500 dilution overnight at 4°C. Detection was performed using the Vectastain Elite ABC HRP Kit followed by the DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit according to the manufacturer's instructions (Vector Laboratories). Slides were counterstained with hematoxylin prior to mounting. Negative controls underwent the same steps but were incubated with the diluent alone without the primary antibody.

#### WESTERN BLOT ANALYSES

Proteins were extracted from freshly isolated and cultured GCs by lysis in SDS loading buffer containing 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol (BioShop). Samples were resolved on 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto Immobilon-PSQ PVDF membrane (MilliporeSigma). Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween 20 (BioShop) (TBST) and sequentially probed with antibodies raised against Phospho-LATS1(Thr1079), LATS1, Phospho-YAP1(S127), Phospho-YAP1(S397), YAP1, Phospho-TAZ(S89), TAZ, Phospho-AKT(S473), AKT, Phospho-p44/42MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204), p44/42MAPK (Erk1/2), Phospho-CREB(S133) and/or CREB at a 1:1000 dilution overnight at 4°C in TBST supplemented with 5% BSA (Bioshop). Membranes were then probed with anti-rabbit IgG HRP Conjugate (Promega) diluted in 5% non-fat powdered milk for 1h at room temperature. When required, membranes were stripped and blocked with 5% non-fat dry milk in TBST before reprobing. Stripping involved two 5-min incubations of stripping buffer (0.2 M glycine [Bioshop]; 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS – MilliporeSigma]; 1% Tween 20; pH adjusted to 2.5), PBS and TBST. The antibody against  $\beta$ -Actin (loading control) was diluted 1:10 000 in 5% non-fat powdered milk and incubated for 30 min at room temperature. Immunosignal was detected with Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (MilliporeSigma). The images were captured with ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) and analyzed with Image Lab Software v.5.0 (Bio-Rad).

#### MICROARRAY ANALYSES AND BIOINFORMATICS

Total RNA extracted from cultured *Yap1<sup>fl/fl</sup>/Taz<sup>fl/fl</sup>* GCs infected either with Ad-Cre for 18h (or Ad-eGFP as a control) or from WT GCs treated with LH for 3h (or PBS as a control) was submitted for triplicate microarray analyses after quality control assessment. The Affymetrix Mouse Clariom S Assay (ThermoFisher) was used and all steps were performed by the McGill

University and Génome Québec Innovation Centre. Data were pre-processed using the Affymetrix Gene Expression Console software (ThermoFisher), and differential analysis of gene expression was done by the R package limma followed by a Student's t-test. Microarray data have been deposited in the GEO database under accession number GSE184396. Raw data from differentially expressed genes (DEGs) in *Erk1/2*-deficient GCs were graciously provided by Joanne S Richards and Heng-Yu Fan (Baylor College of Medicine) (Fan et al., 2009). Cut-off thresholds of  $P \leq 0.05$  and  $|FC| \geq 1.5$  were used to identify DEGs. Overlapping DEGs were identified using a Venn diagram online tool (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Oocyte-specific genes were removed from the overlapping DEG lists, as their presence was presumably caused by oocyte contamination of our primary GC cultures. Gene Set Enrichment Analysis of the overlapping DEGs was performed using either Panther (Mi et al., 2019) ([www.pantherdb.org](http://www.pantherdb.org)), Metascape (Zhou et al., 2019) ([www.metascape.org](http://www.metascape.org)) or DAVID (Huang da, Sherman et Lempicki, 2009) ([www.david.ncifcrf.gov](http://www.david.ncifcrf.gov)) bioinformatics resources. DNA-motif enrichment in the *Areg* promoter was performed using the peak annotation function of the HOMER software for motif enrichment (v4.11) ([www.homer.ucsd.edu/homer/](http://www.homer.ucsd.edu/homer/)).

#### CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION (ChIP)

ChIP experiments were performed using isolated GCs from eCG-primed immature WT mice before or after 60 min of hCG stimulation as described above. 10% of each sample was kept in a separate tube for further assessment of sample quality. Remaining GCs were cross-linked with 1.2ml of 1.1% formaldehyde in PBS at room temperature with agitation. Fifteen minutes later, the cross-linking reaction was stopped by adding 0.125M glycine for 5 min. Cells were then centrifuged (1500g, 5 min, 4°C) and gently resuspended in cold PBS (4°C) twice before being flash-frozen. Cross-linked GCs were first subjected to a nucleus extraction step based on the NEXSON method described in Arrigoni (Arrigoni et al., 2016). Briefly, each sample was resuspended in 500µl of nucleus isolation solution (10 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM NaCl; 0.2% Igepal CA-630 [MilliporeSigma]; protease inhibitors) and then sonicated for 45 seconds at low intensity using the BioRuptor 300 Sonicator (Diagenode). After centrifugation (1000g, 5 min, 4°C), pelleted nuclei were lysed in 100µl of ChIP SDS lysis buffer for 60 min on ice. Lysed nuclei were sonicated for 9 min at high intensity and the resulting chromatin solution was diluted 10-fold in ChIP dilution

buffer. CHIP SDS lysis and dilution buffers were prepared according to Siddappa (Siddappa et al., 2015). Chromatin was immunoprecipitated by overnight incubation at 4°C with 1µg of YAP1 antibody or no antibody as a background control, followed by incubation 2h at 4°C with magnetic Dynabeads™ (ThermoFisher Scientific). Washing of the immunoprecipitate was done as previously described (Siddappa et al., 2015). DNA purification using the Monarch PCR and DNA cleanup kit (New England Biolabs) was preceded by reversal of DNA-protein cross-links at 65°C overnight, and by RNase and proteinase K treatments for 30 min and 2h, respectively.

#### REAL-TIME PCR ANALYSES

Total RNA from GCs was extracted, quantified and reverse transcribed as previously described (Godin et al., 2020). PCR reactions consisted of 2.3µl of water, 6pmol of each forward and reverse gene specific primer (primer sequences are listed in Table S1) and 7.5µl of Advanced qPCR mastermix with Supergreen Lo-ROX (Wisent Inc.) with 4µl of reverse transcribed cDNA diluted 10-fold. Relative mRNA levels were determined using CFX Manager™ Software 3.0 (Bio-Rad), with the mathematical model according to Pfaffl (Pfaffl, 2001) and using *Rpl19* as the housekeeping gene. Following ChIP, PCR reactions consisted 0.64µl of water, 3.6pmol of each forward and reverse primer and 9.64µl of Advanced qPCR mastermix with 1µl of purified chromatin. ChIP-qPCR assays were quantified with a standard curve derived from total DNA (input) and expressed as a percentage of input. The thermal cycling program was the same as previously described (Godin et al., 2020). Real-time PCR reactions were run using a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

#### STATISTICAL ANALYSES

Statistical analyses were done using GraphPad Prism software version 6.01 (GraphPad Software). Data are presented as means ± SEM. P≤0.05 was considered statistically significant. Western blotting data were normalized by the sum of all data points in a replicate as previously described (Degasperi et al., 2014) and were subjected to arcsine transformation, as they are expressed as a proportion (0-1) of the whole replicate. Effects of gonadotropins on Hippo pathway effectors and target genes were analyzed by one-way ANOVA. GC cultures using pharmacologic inhibitors or adenoviruses were analyzed by two-way ANOVA. Dunnett's and Tukey's multiple comparison tests were used to identify differences with the control or between

groups, respectively. Results of the ChIP-qPCR experiment were analyzed by two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test.

## 4.4 Résultats

### Hippo is activated by LH in vivo

To investigate the effect of LH on Hippo signaling, GCs from immature (22- to 25-day old) eCG-primed WT mice were isolated 0, 4, 8 and 12 h following human chorionic gonadotropin (hCG) stimulation. Immunoblotting analyses showed that absolute and relative phosphorylation levels of LATS1 and of YAP1 were significantly increased at 4h post-hCG (Fig. 1A). Phospho-TAZ levels were increased 12h after treatment, but total TAZ levels tended to increase as well, resulting in an unchanged relative phosphorylation level (Fig. 1A). LATS2 protein levels were beneath the detection threshold (not shown). Immunohistochemical analyses showed that, prior to hCG stimulation (indicated as hCG 0h), p-LATS1 and p-YAP1(Ser127) signals were faint and mainly localized to the GCs of growing follicles (Fig. 1B). A 4-hour hCG treatment resulted in a readily apparent increase in p-LATS1 and p-YAP1 levels in GCs, mirroring the immunoblotting data. Levels of p-YAP1 were also elevated in the ovarian stroma after hCG stimulation (Fig. 1B). LATS1 and YAP1 total protein levels were high in GCs of growing follicles in both hCG-stimulated and unstimulated ovaries (not shown). The effect of the ovulatory signal on the mRNA levels of Hippo pathway effectors and target genes was then determined in the GCs from hCG-treated mice. RT-qPCR data showed that hCG induced modest increases in *Lats1*, *Lats2* and *Taz* mRNA levels 12h post-treatment, whereas *Yap1* transcript levels were not affected (Fig. 1C). Treatment with hCG also affected the expression of several canonical Hippo target genes belonging to families of the CCN ECM-associated proteins, BIRC apoptosis inhibitors and TEAD transcription factors. *Tead3* and *Birc5* mRNA levels decreased transiently 4h post-hCG, whereas *Tead1* and *Ccn2* expression significantly increased. Interestingly, *Ccn1* expression increased 12h after treatment. As expected, the expression of *Areg*, a major component of the LH signaling cascade and a known Hippo transcriptional target gene, increased dramatically 4h after hCG stimulation (Fig. 1C). Taken together, these results demonstrate that the ovulatory signal activates the Hippo pathway as early as 4h after hCG treatment, but that this activation does not result in a decrease

either in YAP1/TAZ protein levels or in the mRNA levels of most YAP1/TAZ transcriptional target genes.

### **In vitro stimulation of murine granulosa cells with LH activates the Hippo pathway**

The regulation of Hippo signaling by LH was also investigated in vitro. GCs were isolated from eCG-primed immature mice, placed in culture and treated with human recombinant LH on a time course. As observed in vivo, treatment resulted in the activation of the Hippo pathway. Increased relative levels of p-LATS1(Thr1079), p-YAP1(Ser127 and Ser397) and p-TAZ(Ser89) were observed in response to LH, with peak levels being observed as soon as 30 min after treatment (Fig. 2). LH stimulation had only minimal effects on total protein levels. CREB phosphorylation was used as a positive control to validate the effectiveness of the LH treatment and increased rapidly in response to treatment as expected. These results demonstrate that in vitro treatment of murine GCs with LH induces a rapid activation of the Hippo pathway similar to what is observed in vivo, further supporting our hypothesis that Hippo mediates the LH response.

### **PKA mediates the activation of the Hippo pathway by LH**

To determine the mechanism whereby LH activates Hippo, the three major signaling pathways activated downstream of the LH receptor were evaluated, namely cAMP/PKA, PI3K/AKT and ERK1/2 pathways. Cultured eCG-primed WT GCs were pretreated (or not) with the PKA inhibitors H-89 and PKI, the AKT1/2/3 inhibitor MK-2206 or the MEK1/2 inhibitor U0126, followed by treatment with LH for 30 min. Treatment with inhibitors had no effect on basal levels of YAP1 phosphorylation (at Ser127 or Ser397; Fig. 3). However, LH-dependent phosphorylation of YAP1 on Ser127 and Ser397 was inhibited by H-89 and PKI (Fig. 3, S1 and S2). MK-2206 or U0126 alone (Fig. S1) or combined (Fig. S2) had no effect on LH-induced YAP1 phosphorylation. Likewise, their concomitant pretreatment with H-89 did not result in a greater effect than H-89 alone (Fig. S2). All inhibitors were effective, as they were able to inhibit LH-dependent phosphorylation of CREB (H-89, PKI), AKT (MK-2206) and ERK1/2 (U0126) (Fig 3, S1 and S2). Together, these results indicate that LH acts via the cAMP/PKA pathway to activate Hippo signaling in murine GCs.

### ***Yap1/Taz* knockdown blunts the LH response by preventing ERK1/2 activation**

After elucidating the mechanism by which Hippo is activated downstream of the LH receptor (LHCGR), the potential role of Hippo signaling in mediating LH action was investigated. To do so, GCs isolated from mice bearing floxed alleles for *Yap1* and *Taz* (*Yap1<sup>f/f</sup>;Taz<sup>f/f</sup>*) were placed in culture and infected with adenoviruses to drive expression of eGFP (Ad-eGFP, control) or Cre recombinase (Ad-Cre, to inactivate the floxed alleles), followed or not by treatment with LH for 2h. In this model, knockdown of *Yap1* and *Taz* mRNA levels of approximately 10-fold were achieved after 18h of adenovirus treatment (Fig. 4A). LH-induced expression of *Areg*, *Pgr* and *Ptgs2* – but not *Ereg*, *Btc* and *Egfr* – was significantly impaired by *Yap1/Taz* knockdown (Fig. 4A). Similar results were obtained with 1 and 6 h of LH treatment (Fig. S3). Among the genes investigated, *Lhcgr* was the only gene whose expression was downregulated following loss of *Yap1/Taz*, regardless of LH treatment. To determine if the above-mentioned blunted induction of LH target genes was simply due to *Lhcgr* downregulation, a similar experiment was conducted using forskolin (FSK – a stimulator of adenylate cyclase, which acts downstream of the LHCGR to increase cAMP levels). This showed that the FSK-mediated induction of *Areg*, *Ptgs2* and *Tnfrsf25* was blunted by the loss of *Yap1/Taz* similarly to the LH-treated cells (Fig. 4B). This suggests that YAP1/TAZ participate in the transduction of the LH signal somewhere downstream of cAMP.

To identify the components of the LH cascade affected by the loss of *Yap1/Taz*, we conducted a similar experiment and evaluated phosphorylation levels of CREB and ERK1/2. Ad-Cre treatment for 24h lowered YAP1/TAZ protein levels to approximately 30-40% those of the controls (Fig. 4C). As expected, treatment with LH activated the cAMP/PKA and ERK1/2 pathways. Loss of YAP1/TAZ did not affect phosphorylation levels of CREB on its activating site (Ser 133), suggesting that the cAMP/PKA/CREB component of the LH signaling cascade remained intact (Fig. 4C). However, loss of YAP1/TAZ resulted in decreased phosphorylation of the ERK1/2 kinases on threonine 202 and tyrosine 204 residues (Fig. 4C), both with and without LH stimulation. Taken together, these results indicate that YAP1/TAZ are necessary for the adequate activation of the ERK1/2 pathway – but not the PKA/CREB pathway – and for the induction of several LH target genes in murine GCs.

### ***Yap1* and *Taz* regulate a subset of LH target genes**

In order to highlight specific roles of YAP1/TAZ in murine GC physiology, we conducted a microarray analysis of genes differentially expressed in cultured *Yap1<sup>f/f</sup>;Taz<sup>f/f</sup>* GCs infected for 18h with the Ad-Cre virus or Ad-eGFP (control). We found that 130 genes were upregulated and 488 were downregulated in cells in which *Yap1/Taz* were knocked down. Using the PANTHER Classification System, we were able to show that these genes are involved in various biological processes, a small proportion of which related to reproduction (red and magenta – Fig. 5A). We then compared this data with a microarray analysis of differentially expressed genes following LH treatment of GCs isolated from WT mice. We show that a sizeable proportion of genes downregulated in the absence of *Yap1/Taz* ( $\approx 13\%$ , 63 of 488) are the same genes that are induced by LH (Fig. 5B, Table 1). Analysis of this sub-fraction of genes using the Metascape Annotation tool highlighted biological processes related to ovulation, angiogenesis and female gonad development (blue and dark green – Fig. 5C, Table 1). Additional analysis with DAVID identified similar biological processes (Table S2). Given that *Yap1/Taz* knockdown prevented the adequate activation of the ERK1/2 pathway (Fig. 4C), we then compared our analysis of genes differentially expressed following *Yap1/Taz* knockdown to previously published microarray data of *Erk1/2*-depleted GCs from eCG-primed mice 2.5h after hCG stimulation (Fan et al., 2009). Among all the genes downregulated following *Yap1/Taz* knockdown, 32 of them were also downregulated following *Erk1/2* loss (Fig. 5D, Table 1). As expected, bioinformatic analysis of this subfraction of genes using Metascape and DAVID software identified biological processes of ovulation, angiogenesis and transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway (Table S3). The above results therefore indicate that YAP1/TAZ are involved in the regulation of several LH- and ERK1/2-dependent genes, but also regulate large numbers of additional genes in murine GCs.

### **YAP1 regulates LH responsiveness through the direct transcriptional regulation of *Areg***

We showed that loss of *Yap1/Taz* results in a blunted LH-dependent induction of *Areg* and in a decreased activation of the ERK1/2 pathway (Fig. 4). Given that AREG activates ERK1/2 via the EGF receptor, and that *Areg* has been previously shown to be a direct transcriptional target of the Hippo pathway in other cellular contexts (Kim et al., 2020; Zhang et al., 2009), we



hypothesized that YAP1 regulates LH responsiveness in GCs through the transcriptional regulation of *Areg*. A chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiment was therefore conducted using a YAP1 antibody on GCs isolated from eCG-primed mice treated (or not) with hCG for 60 min, followed by an in silico analysis of the *Areg* promoter region (from -4500bp to +1300bp around the TSS) to locate DNA motifs of the YAP1/TAZ binding partners belonging to the TEAD family of transcription factors (TEAD4;  $\approx$ -2150 and -2950 from the *Areg* transcription start site [TSS]) (Additional file 1 (Godin, Tsoi, Morin, Gévry et Boerboom, 2022)). qPCR analyses of chromatin fragments enriched from the ChIP were performed using primers designed to amplify regions surrounding the aforementioned motifs and other regions closer to the TSS. Unexpectedly, there was no enrichment of YAP1-bound DNA fragments around the TEAD4 motifs. Instead, YAP1 was significantly ( $\approx$ 5-fold) recruited near the *Areg* TSS 60 min following hCG treatment (Fig. 6). In contrast, GCs isolated from mice that were only primed with eCG (that did not receive hCG) had low YAP1-enrichment levels, comparable to the no-antibody control (Fig. 6 and not shown). These results indicate that YAP1 is rapidly recruited to the promoter of *Areg* following hCG stimulation.

## 4.5 Discussion

### Amphiregulin is transcriptionally regulated by Hippo in murine granulosa cells

Successful ovulation is dependent on the orchestrated response of every follicular cell type to the LH surge. *Areg* has a central role in the transmission of the LH signal to cumulus cells and oocyte, neither of which express *Lhcgr*. Its rapid upregulation and release in the extracellular space of mural granulosa cells in response to the LH signal is necessary for the activation of EGFR and, subsequently, ERK1/2 (Fig. 7). This in turn leads to cumulus expansion, oocyte maturation, luteinization and follicle wall rupture. YAP1 has been shown to directly regulate *Areg* transcription in a mammary gland epithelial cell line (Zhang et al., 2009), although the transcription factor to which YAP1 binds in this context has not been identified. More recently, TAZ has been reported to directly regulate *Areg* expression via interaction with TEAD and subsequent binding to a TEAD binding site 1.8kb upstream of the *Areg* TSS (Kim et al., 2020). In the present study, we found a marked recruitment of YAP1 at the proximal promoter of *Areg* in GCs isolated from WT mice 60

min after hCG stimulation (Fig. 7). YAP1 enrichment was located near the TSS and not around putative TEAD4 binding sites in the *Areg* promoter. It is possible that YAP1 interacts with a yet unidentified transcription factor that bind near the TSS. YAP1 recruitment near the *Areg* TSS might also be the result of an interaction of the basal transcriptional machinery with YAP1 bound to an unidentified distal enhancer, perhaps located beyond the region that was investigated by CHIP-qPCR. Such interaction between YAP1/TAZ/TEAD-bound enhancers with promoters via chromatin looping has been reported in the *Myc* and *Top2a* genes in an epithelial human breast cancer cell line (Zanconato et al., 2015). In our model, we were unable to identify the transcription factor(s) that YAP1 interacts with to regulate the transcription of *Areg*, nor the precise location of their relevant DNA binding site(s). Nevertheless, our results demonstrate for the first time that *Areg* is a direct transcriptional target of Hippo in the early events of ovulation in murine GCs.

#### **YAP1/TAZ are required for the adequate induction of several LH target genes and for the activation of the ERK1/2 pathway**

In this study, we demonstrate the role of YAP1/TAZ in the induction of several ovulation-related genes following LH stimulation. Only one other previous study investigated the role of *Yap1* in regulating LH transcriptional target genes in murine GCs. It showed that *Yap1* knockdown prior to GC stimulation with forskolin (FSK) and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) resulted in increased levels of *Areg*, *Ereg*, *Btc*, *Ptx3*, *Sult1e1* and *Lhcgr* expression (Ji et al., 2017). The same study also reported lower induction levels of *Areg*, *Ereg*, *Sult1e1* and *Tnfaip6* by FSK+PMA following 24h of YAP1 overexpression. These findings therefore appear to contradict those reported in this study. The discrepancies could be explained by differences in cell culture conditions, methods used to manipulate *Yap1/Taz* expression, the nature of the agonists that were used and the duration of treatments. Pretreatment of bovine mural GCs with verteporfin (VP), an inhibitor of YAP1-TEAD interaction (Liu-Chittenden et al., 2012), was shown to prevent the upregulation of *Ereg* by LH (Dos Santos, Lalonde-Larue, et al., 2021). This difference might be explained by a greater role of *Ereg* (and a lesser role for *Areg*) in the acute response of bovine mural GCs to LH (Portela, Zamberlam, Gonçalves, de Oliveira et Price, 2011).

The present study also identified lower basal levels of ERK1/2 activity following *Yap1/Taz* knockdown, highlighting the requirement for *Yap1/Taz* expression in GCs even prior to LH stimulation. A similar effect on ERK1/2 activity was previously shown in bovine GCs treated with inhibitors of YAP1-TEAD interaction (Dos Santos, Lalonde-Larue, et al., 2021). As ERK1/2 regulate the expression of a wide variety of genes involved in the ovulation process (Fan et al., 2009), this lower basal level of ERK1/2 activity is purported to be the cause of the blunted induction of ovulation-related genes, which was observed *Yap1/Taz*-deficient GCs in response to LH. The EGFR pathway was recently identified as a likely mediator of YAP1 actions in murine GCs, as *Yap1* knockdown dramatically reduced *Egfr* expression (Lv et al., 2019). Differences in the knockdown method used might explain why *Egfr* expression was unchanged in our *Yap1/Taz* knockdown model. Importantly, loss of *Yap1/Taz* expression had no effect on PKA/CREB pathway activation by LH. For this reason, the effects of YAP1/TAZ disruption could not be attributable solely to *Lhcgr* downregulation, as PKA/CREB activity would also have been affected. This further points to AREG as a likely mediator of YAP1/TAZ regulation of LH signaling, as it binds to EGFR to activate ERK1/2 signaling without affecting PKA. Together, these findings indicate that YAP1/TAZ activity is required prior to the LH surge to allow the adequate induction of several LH-dependent genes. The mechanism of YAP1/TAZ action in this context involves the regulation of the ERK1/2 pathway and is independent of PKA/CREB activation (Fig. 7).

### **PKA-dependent Hippo activation following the LH surge**

Inactivation of the Hippo pathway promotes nuclear localization of YAP1 and TAZ, their interaction with transcription factors and subsequent transcriptional co-regulatory activity. It is well described in the literature that Hippo inactivation is necessary for GC proliferation and steroidogenesis (Fu et al., 2014; Plewes et al., 2019). The activation of the Hippo pathway reported in the current study is in line with results of previous reports that showed YAP1 and TAZ phosphorylation following the ovulatory signal (Ji et al., 2017; Lv et al., 2019; Sun et Diaz, 2019). In addition, this study shows that LH promotes phosphorylation of LATS1. Using pharmacologic inhibitors, we showed that the mechanism responsible for Hippo activation by LH involves PKA (Fig. 7) and is independent of the PI3K/AKT and ERK1/2 pathways. This finding is consistent with

a previous report of phosphorylation of YAP1 by a constitutively active PKA in rat GCs (Puri et al., 2016). The cAMP/PKA pathway has also been reported to be involved in YAP1 phosphorylation in other cellular contexts (Kim et al., 2013; Yu et al., 2013; Yu et al., 2012). Ji *et al.* identified the ERK1/2 pathway as likely being involved in Hippo activation following the LH signal (Ji et al., 2017). Using *Erk1/2* depleted GCs and the same MEK1/2 inhibitor used in the present study, they concluded that an intact ERK1/2 pathway is needed for the phosphorylation of YAP1. However, in our model, pharmacologic inhibition of the ERK1/2 pathway had no effect on YAP1 phosphorylation levels. Again, differences in experimental conditions including culture methods and timing may explain these discrepancies.

Although our results showing that phosphorylation/inactivation of YAP1/TAZ occurs in response to the ovulatory signal might appear to conflict with the aforementioned requirement of YAP1/TAZ for the induction LH-dependent genes, we believe that these two findings are, in fact, compatible. Prior to (and likely during the early steps of) activation of the LH cascade, YAP1/TAZ transcriptional co-regulatory activity appears necessary. However, their nuclear presence may subsequently inhibit the longer-term effects of LH, thus necessitating Hippo activation to abrogate their transcriptional activity. Indeed, YAP1 overexpression in GCs has been shown to impair progesterone production, a marker of luteal cell activity (Lv et al., 2019). Further experiments involving the sustained activation of YAP1 and TAZ in the hours following hCG stimulation may confirm their negative impact on LH action in the longer term. It should be noted that the induction of *Areg* by LH is both rapid and transient (Park et al., 2004) (Fig. 1C), suggesting that, while YAP1 participates in the initial increase in its transcription, Hippo activation could then contribute to its subsequent downregulation by phosphorylating YAP1.

### **YAP1/TAZ regulates a wide variety of genes in granulosa cells, many of which are involved in biological processes related to ovulation**

Another important finding reported in the present study is the large proportion of genes downregulated following *Yap1/Taz* knockdown that are upregulated by LH in murine GCs. Among these overlapping genes, many play well-established roles in the ovulation process, such as *Ereg*, *Hsd3b1*, *Inhba*, *Kdr*, *Plat*, *Plau*, *Plk2*, *Ptgs2*, *Sfrp4* and *Tnfaip6*. Genes involved in angiogenesis

were also overrepresented, which was expected considering that the growth of blood vessels is a hallmark in the formation of the corpus luteum (Redmer et Reynolds, 1996). Although others have previously identified and categorized differentially expressed genes in GCs undergoing luteinization (Shirafuta et al., 2021), our finding that YAP1/TAZ are required for the adequate expression of a large set of ovulation-related genes in this context is novel. Nonetheless, our microarray results also indicate that most genes differentially expressed following YAP1/TAZ knockdown are unrelated to LH actions. This suggests a wider involvement of the Hippo pathway in GC physiology that will require further investigation.

In summary, the present study elucidated mechanisms involved in the interplay between the Hippo pathway and the LH cascade (Fig. 7). YAP1/TAZ were found to be required for the induction of a variety of LH-dependent genes, likely through the activation of the ERK1/2 pathway. The LH signaling cascade was also found to activate Hippo through a PKA-dependent mechanism. This study also reports for the first time the direct transcriptional regulation of *Areg* by YAP1 in GCs, providing a plausible mechanism whereby YAP1 may mediate the activation of ERK1/2. Further investigation into the interactions between the Hippo pathway and the LH cascade in granulosa cells would benefit our understanding of the ovulation process and its many components. This will in turn allow the development of more targeted therapies for the treatment of ovarian diseases such as polycystic ovarian syndrome, the inhibition of ovulation for contraceptive purposes, or the optimization of ovarian stimulation protocols crucial to IVF.

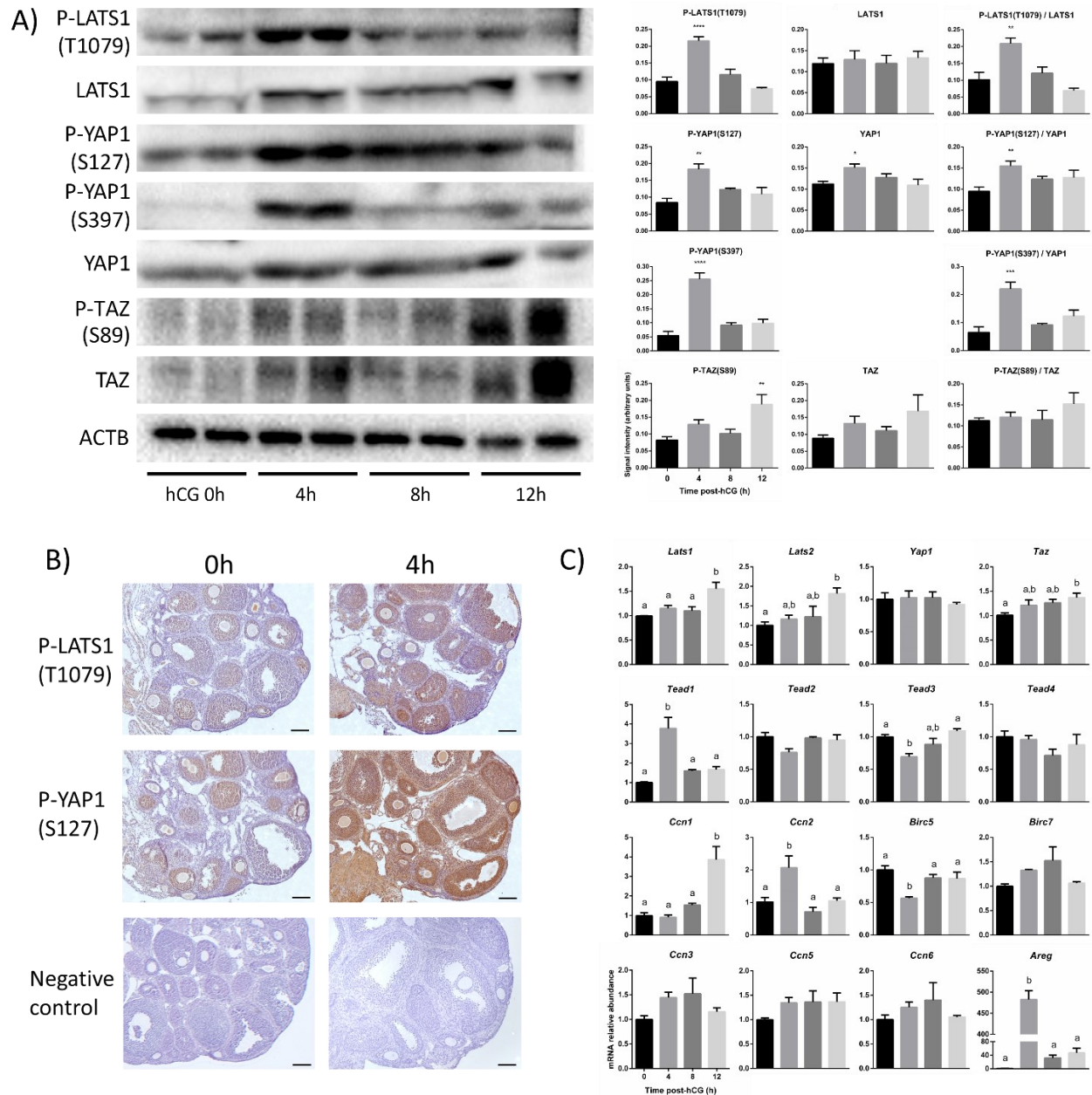
## 4.6 Remerciements

The authors thank Dr Charlène Rico, Ms Meggie Girard and Mr Francis Marien-Bourgeois for technical support. We thank Eric Olson (UT Southwestern) for providing the Yap1- and Taz-floxed mice, and we thank Joanne S Richards and Heng-Yu Fan (Baylor College of Medicine) for providing microarray raw data from Erk1/2-deficient GCs.

## 4.7 Financement

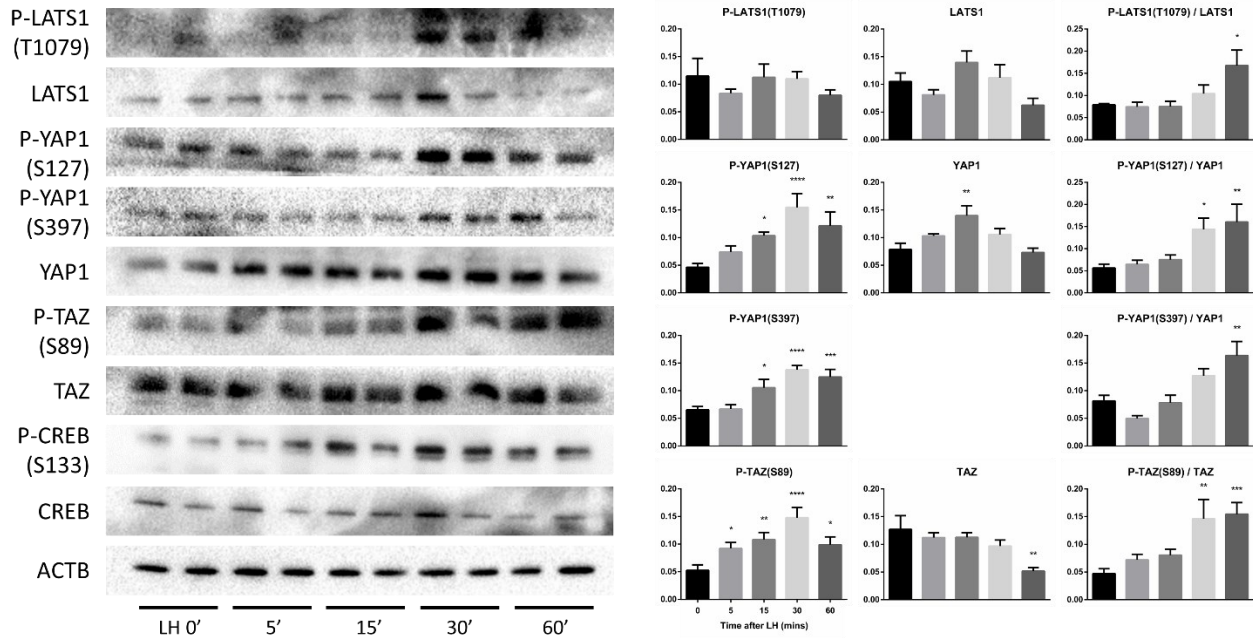
This work was supported by project grants of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to DB (MOP-142445) and to NG (MOP-12596). NG holds a Chercheur boursier (senior) award from the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS). PG and MFT were supported by doctoral training research fellowships from the Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS).

## 4.8 Figures



**Figure 1.** – The ovulatory signal activates the Hippo pathway in granulosa cells in vivo

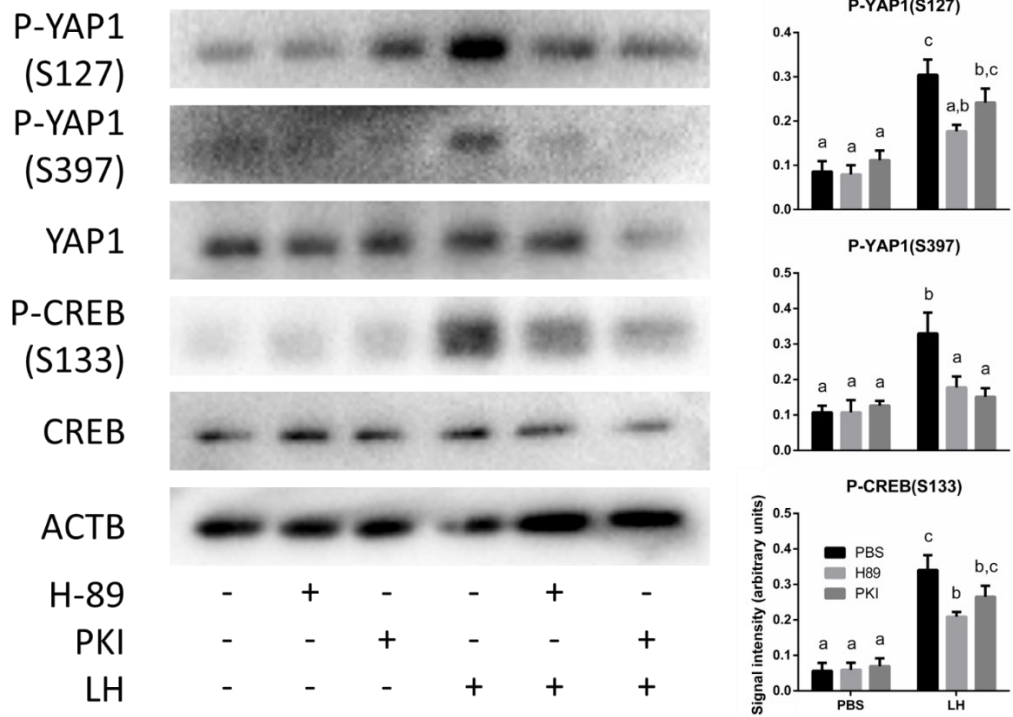
A) Levels of Hippo pathway effectors in GCs of eCG-primed mice treated with hCG on a time course. Immunoblots show 2 replicates per time point, whereas quantification was done using 4 replicates per time point. Each replicate represents the ovaries of one mouse.  $\beta$ -Actin (ACTB) was used as the loading control. Data were normalized by the sum of all data points in a replicate and were subjected to arcsine transformation, as they are expressed as a proportion (0-1) of the whole replicate. Data were compared to 0h hCG. One-way ANOVA (Dunnet's post hoc test): \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ . B) Immunohistochemical analyses of P-LATS1(T1079) and P-YAP1(S127) were performed on ovarian sections from immature eCG-primed mice prior to or after 4h of hCG. Negative controls were incubated without the primary antibody. Scale bars are 100 $\mu$ m. C) RT-qPCR analyses of Hippo pathway effectors and target genes were performed on GCs isolated from immature eCG-primed mice treated with hCG on a time course (n=4 mice/time point, done three times). All data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19*. Different letters above histograms indicate significant differences between groups. One-way ANOVA (Tukey's post hoc test):  $P \leq 0.05$ .



**Figure 2.** – LH activates the Hippo pathway in granulosa cells in vitro

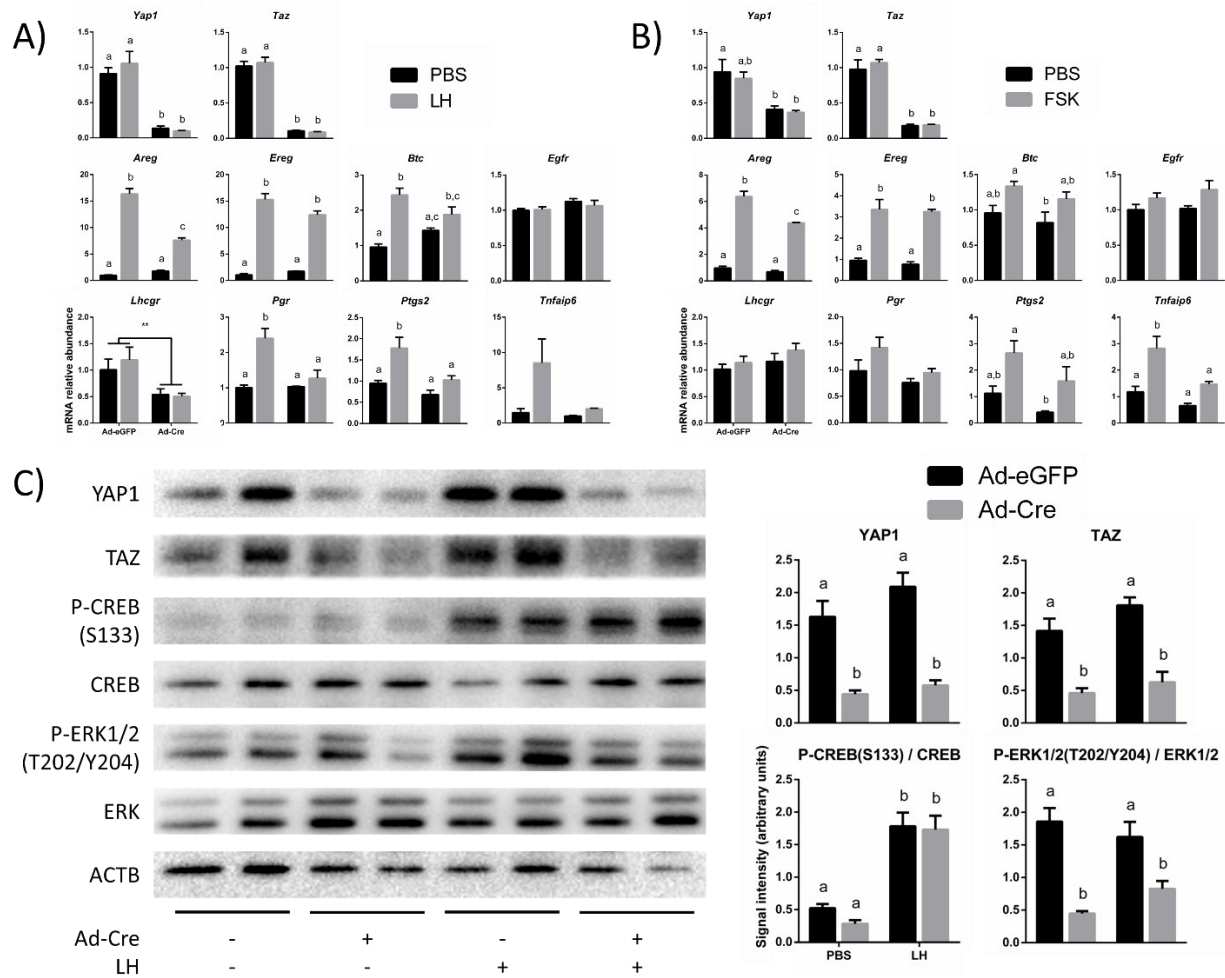
Primary GCs were treated with or without LH on a time course and the expression of the indicated proteins was evaluated by western blotting. Representative immunoblots show 2 replicates per time point, whereas quantification was done using 4 replicates per time point.  $\beta$ -Actin (ACTB) was used as the loading control. Data were normalized by the sum of all data points in a replicate and were subjected to arcsine transformation, as they are expressed as a proportion (0-1) of the whole replicate. Data were compared to 0 min LH. One-way ANOVA (Dunnet's post hoc test): \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ .





**Figure 3.** – LH acts via PKA to phosphorylate YAP1

Primary cultured GCs were pretreated with or without inhibitors against PKA (H-89 or PKI) followed by treatment with LH or vehicle control for 30 min. Representative immunoblots show 1 replicate per condition, whereas quantification was done using 4 replicates per condition.  $\beta$ -Actin (ACTB) was used as the loading control. Data were normalized by the sum of all data points in a replicate and were subjected to arcsine transformation, as they are expressed as a proportion (0-1) of the whole replicate. Different letters above histograms indicate significant differences between treatment conditions. Two-way ANOVA (Tukey’s post hoc test):  $P \leq 0.05$ .

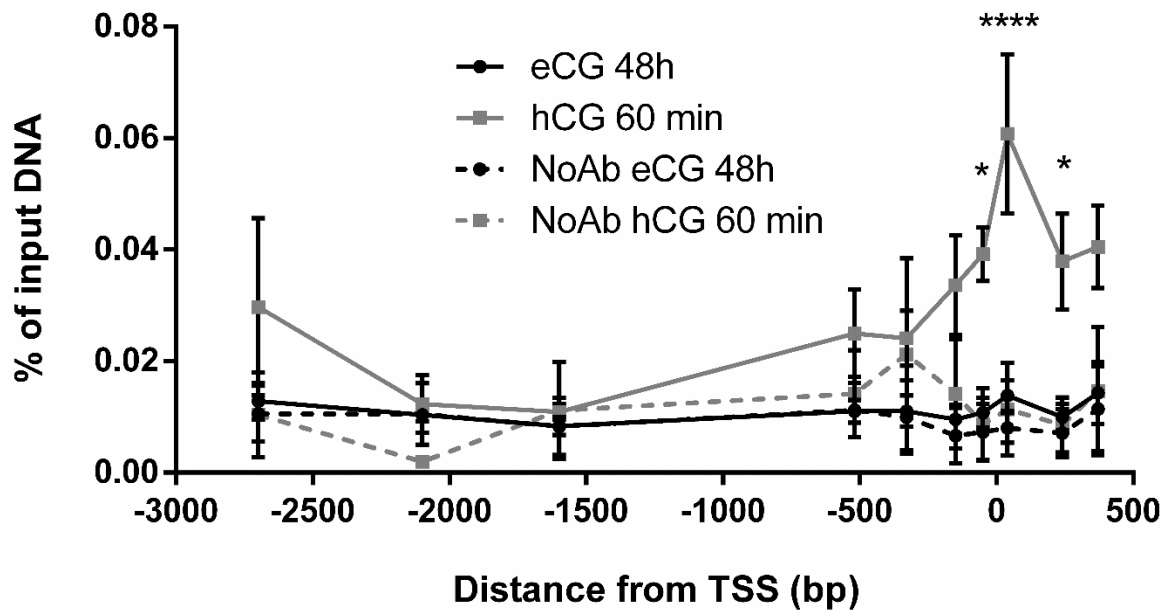


**Figure 4. – Loss of *Yap1* and *Taz* blunts LH responsiveness**

A-B) Primary GCs isolated from *Yap1<sup>f/f</sup>;Taz<sup>f/f</sup>* mouse ovaries were infected with adenoviruses expressing either Cre recombinase (Ad-Cre; to knockdown *Yap1* and *Taz* expression) or eGFP (Ad-eGFP; control) for 18h. GCs were treated with either LH (A), FSK (B) or PBS (control) for 2h (n=4 replicates/treatment, done three times). Data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19*.

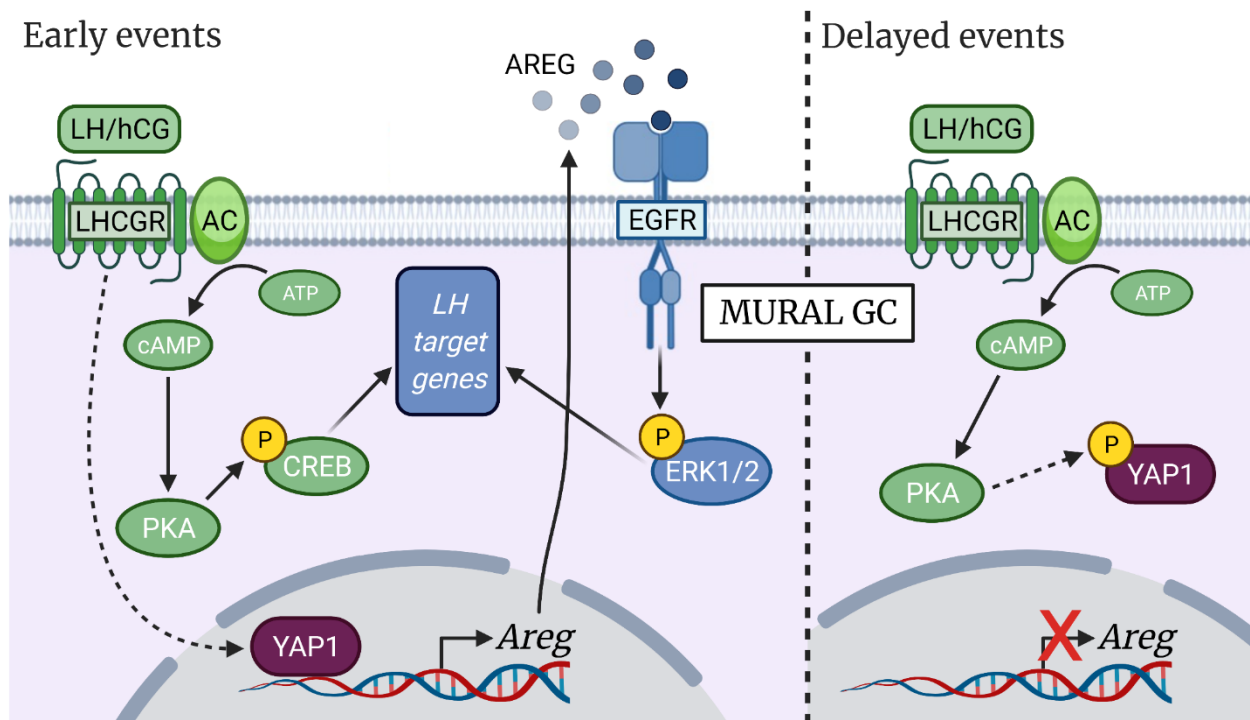
C) Primary *Yap1<sup>f/f</sup>;Taz<sup>f/f</sup>* GCs were infected with Ad-Cre for 24h (Ad-eGFP for control). GCs were treated with LH (PBS for control) for 30 min. Representative immunoblots show 2 replicates per condition, whereas quantification was done using 12 replicates per condition.  $\beta$ -Actin (ACTB) was used as the loading control. Data were all normalized by the sum of all data points in a replicate and were subjected to arcsine transformation, as they are expressed as a proportion (0-1) of the whole replicate. Different letters above histograms indicate significant differences between treatment conditions. Two-way ANOVA (Tukey's post hoc test):  $P \leq 0.05$ .





**Figure 6.** – YAP1 is recruited to the *Areg* promoter following hCG stimulation

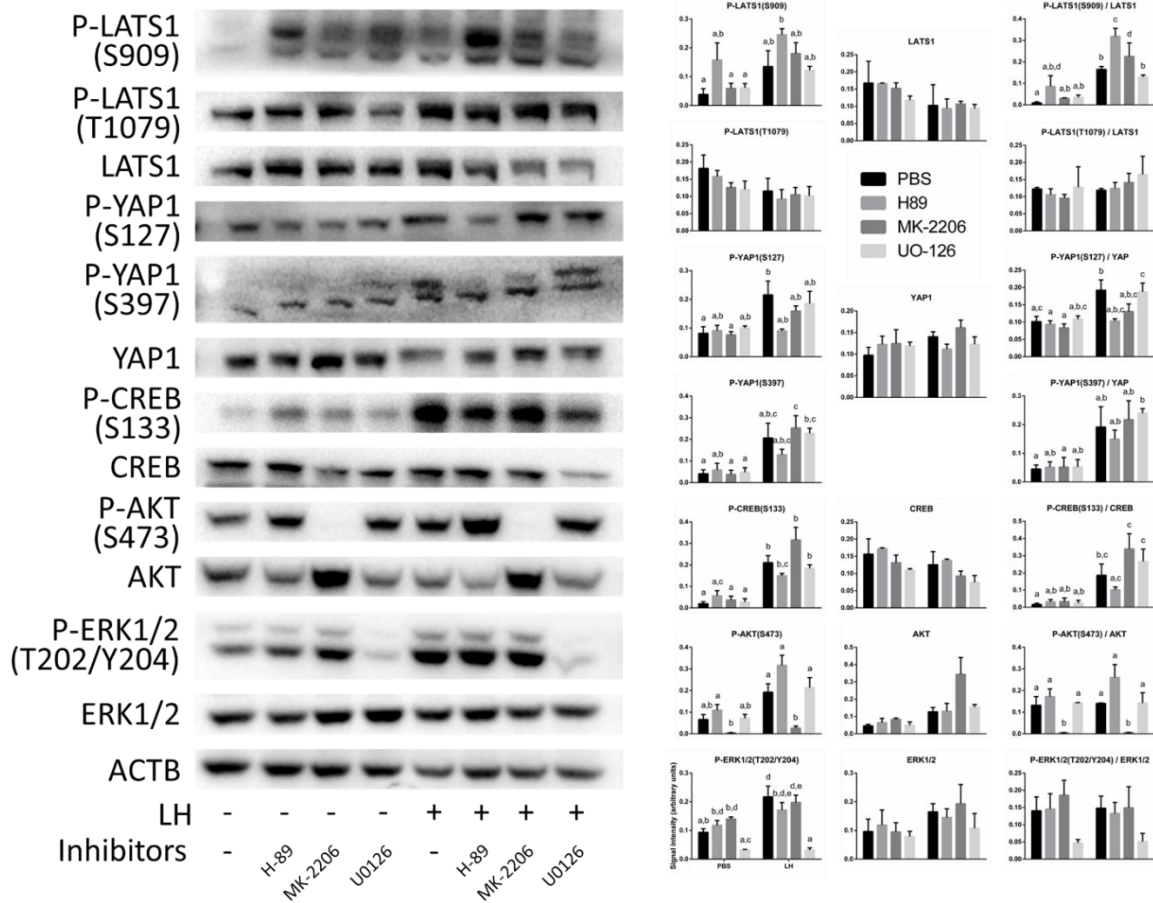
ChIP-qPCR analyses were performed on GCs isolated from eCG-primed WT mice before (black lines) or after (grey lines) 60 min of hCG stimulation to evaluate the enrichment of YAP1 on the *Areg* promoter. The no antibody control (NoAb) appears as dotted lines. n=4 biological replicates/timepoint, one replicate contains the GCs of 4 mice. Data are expressed as percentage of input DNA. Two-way ANOVA (Sidak's post hoc test): \* $P \leq 0.05$ , \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ .



**Figure 7.** – The Hippo pathway plays an essential role in the regulation of the LH cascade

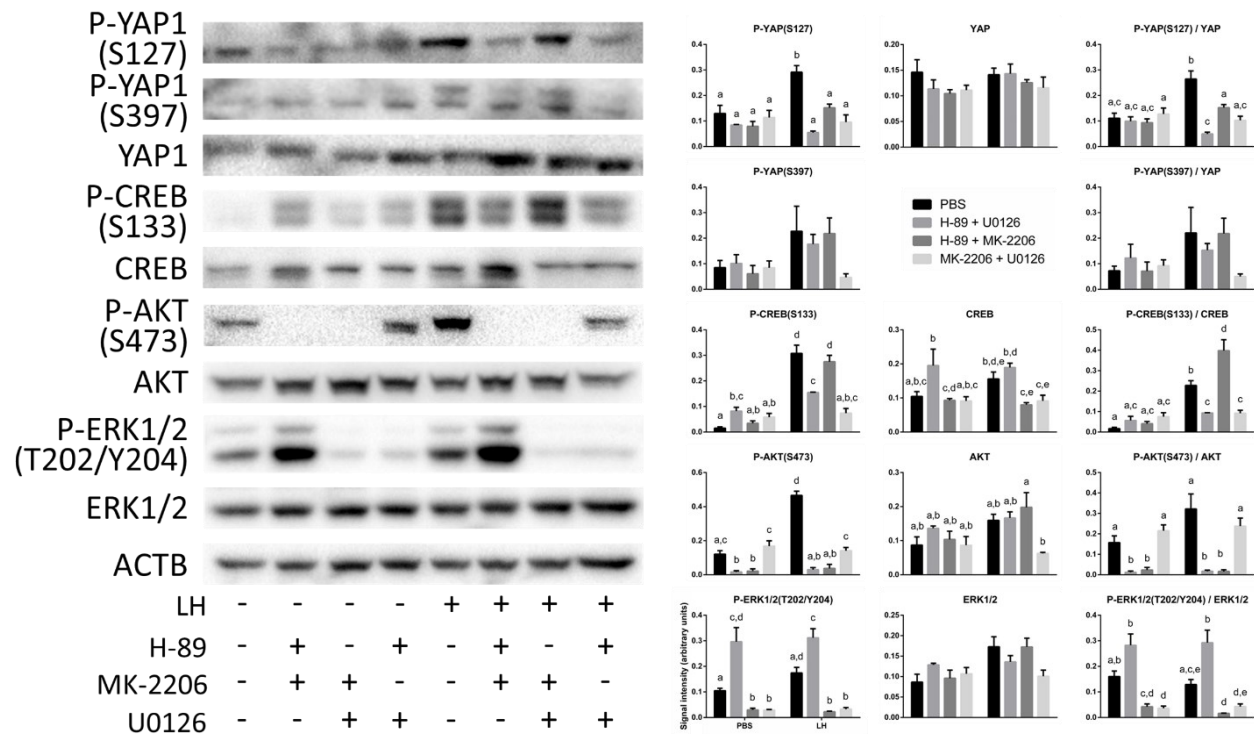
Early events: Following binding of LH to its receptor, CREB is activated and YAP1 is recruited in proximity to the transcription start site of the *Areg* promoter. The latter contributes to the rapid upregulation of *Areg* in response to the LH stimulus. High extracellular levels of AREG contribute to the activation of the EGFR and downstream ERK1/2 pathway, and to the regulation of several LH-dependent genes. Delayed events: Granulosa cell stimulation by LH subsequently activates the Hippo pathway, resulting in YAP1 phosphorylation through a PKA-dependent mechanism. This Hippo activation is thought to be necessary for the transient expression pattern of *Areg* and for prolonged LH effects. Dashed arrows indicate a relation for which unidentified intermediate effectors may be involved.

## 4.9 Figures supplémentaires



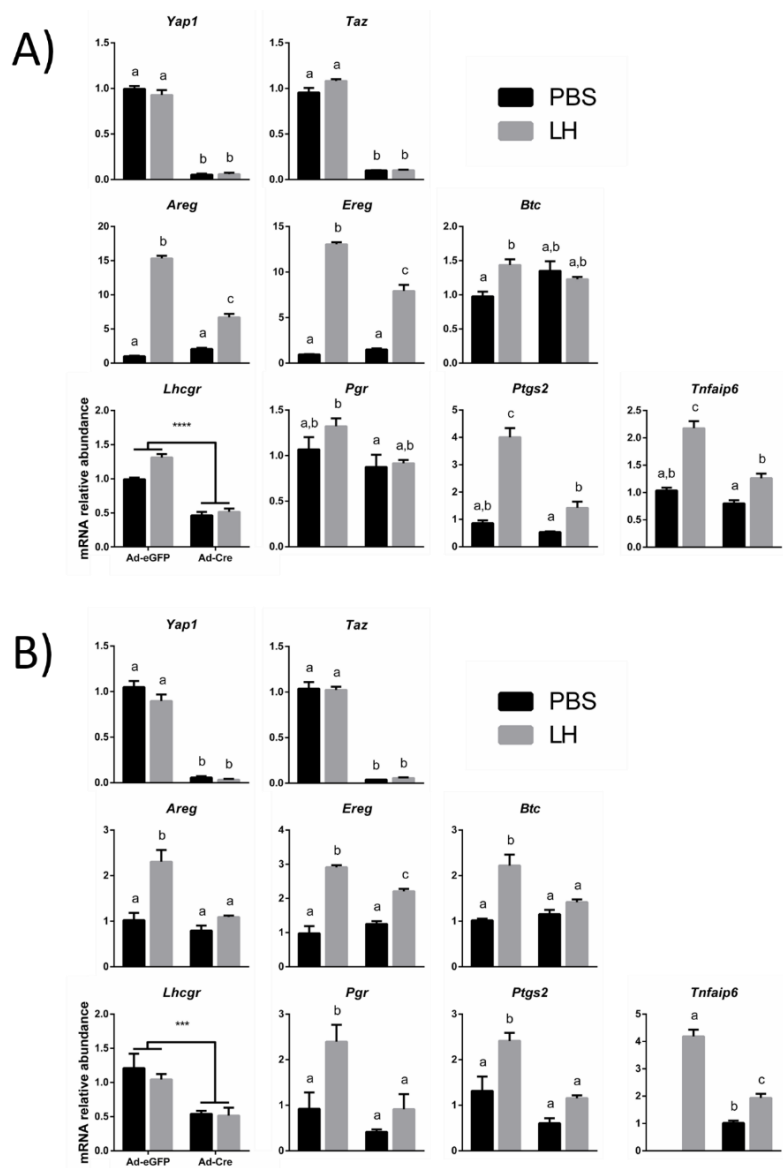
**Figure S1.** – PI3K/AKT and ERK1/2 pathways alone are not involved in the LH-dependent activation of the Hippo pathway in granulosa cells

Primary cultured GCs were pre-treated with or without inhibitors against PKA (H-89, 50 $\mu$ M for 30 mins), AKT1/2/3 (MK-2206, 10 $\mu$ M for 60 mins) or MEK1/2 (UO126, 10 $\mu$ M for 60 mins) followed by treatment with LH (50 ng/ml) or vehicle control for 30 mins. Representative immunoblots show 1 replicate per condition, whereas quantification was done using 4 replicates per condition. CREB, AKT and ERK1/2 are well established substrates of PKA, AKT (by auto-phosphorylation) and MEK1/2 in GCs and confirmed the inhibition by H-89, MK-2206 and UO126, respectively.  $\beta$ -Actin (ACTB) was used as the loading control. Data are normalized by the sum of all data points for each replicate and are represented as means  $\pm$  SEM. Different letters above histograms indicate significant differences between treatment conditions.  $P \leq 0.05$ ; two-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test.



**Figure S2.** – The PI3K/AKT and ERK1/2 pathways do not synergistically act with PKA in the LH-dependent activation of the Hippo pathway in granulosa cells

Primary cultured GCs were pre-treated with pairs of inhibitors against PKA (H-89, 50 $\mu$ M for 30 mins), AKT1/2/3 (MK-2206, 10 $\mu$ M for 60 mins) and MEK1/2 (U0126, 10 $\mu$ M for 60 mins), followed by treatment with LH (50 ng/ml) or vehicle control for 30 mins. Representative immunoblots show 1 replicate per condition, whereas quantification was done using 4 replicates per condition. CREB, AKT and ERK1/2 are well established substrates of PKA, AKT (by auto-phosphorylation) and MEK1/2 in GCs and confirmed the inhibition by H-89, MK-2206 and U0126, respectively.  $\beta$ -Actin (ACTB) was used as the loading control. Data are normalized by the sum of all data points for each replicate and are represented as means  $\pm$  SEM. Different letters above histograms indicate significant differences between treatment conditions.  $P \leq 0.05$ ; two-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test.



**Figure S3.** – Loss of *Yap1/Taz* blunts the granulosa cell response to 1- and 6-hour LH treatments

Primary GCs isolated from *Yap1<sup>f/f</sup>;Taz<sup>f/f</sup>* mouse ovaries were infected with adenoviruses expressing either Cre recombinase (Ad-Cre; to knockdown *Yap1* and *Taz* expression) or eGFP (Ad-eGFP; control) for 18 hours. After 2 hours of culture in serum-free medium, GCs were treated with 50 ng/ml LH or vehicle control for A) 1 or B) 6 hours (n=4 replicates/treatment). All data were normalized to the housekeeping gene *Rp19*. Data are represented as means  $\pm$  SEM. Different letters above histograms indicate significant differences between groups.  $P \leq 0.05$ ; two-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test.



## 4.10 Tableaux

**Tableau 1.** – List of genes downregulated following loss of *Yap1/Taz* whose expression is LH and/or *Erk1/2* dependent.

Gene Symbol	FC in <i>Yap1/Taz</i> depleted GCs	FC in LH-stimulated GCs	FC in <i>Erk1/2</i> depleted GCs
Abi3bp	-1.60		-1.91
Arhgap32	-1.51	1.62	
Arid5b	-1.90		-1.56
Arrdc3	-1.88	2.94	
Bpgm	-1.57	1.61	
Bzw1	-1.72	1.51	
Cblb	-1.59		-2.46
Ccn1	-1.56	1.88	
Ccno	-1.76	4.41	
Cited2	-2.00		-2.00
Cpne3	-1.52		-1.96
Efnb2	-1.63	1.58	-4.58
Egr1	-1.62		-37.71
Emb	-1.53		-3.67
Emp1	-1.69		-5.60
Ereg	-1.55	7.70	-2.09
Errfi1	-2.25		-6.00
Fam107b	-1.95	1.77	
Far1	-1.75	1.67	
Fbxw14	-1.70	2.95	
Fbxw15	-1.62	3.51	
Fbxw19	-1.86	2.89	
Fbxw20	-2.14	3.08	
Fbxw21	-2.88	2.40	
Fbxw22	-1.64	2.26	
Ggct	-1.56	1.55	
Glrx	-1.92	1.54	
Gng3	-1.94	1.64	
Hccs	-1.93		-1.61
Hsd3b1	-1.81	1.54	
Igf2bp2	-1.83	1.69	
Il23a	-1.59		-2.67
Inhba	-2.02	3.64	
Jag1	-2.03	1.62	-1.75
Kdr	-1.94	1.69	
Khdc1a	-1.63	1.69	
Lrrc8c	-1.54		-1.86

Mid1	-1.58	1.87	-3.12
Nfya	-1.97	1.52	
Nlrp14	-2.09	2.69	
Nlrp2	-1.53	1.87	
Nlrp4a	-2.31	1.74	
Oas1c	-1.64	2.78	
Oas1e	-2.15	2.80	
Osgin2	-1.96	3.23	-1.69
Phldb2	-1.61		-4.09
Pik3r1	-1.73		-2.63
Plat	-1.80	1.56	
Plau	-1.54	2.03	-10.36
Plk2	-1.59	3.71	-2.47
Prkg2	-1.59		-2.64
Ptgs2	-3.06	1.98	-42.47
Ptp4a1	-1.51	2.42	
Rbm47	-1.96	1.54	-3.11
Rgs2	-2.13	3.05	
Rnd3	-1.72	1.51	-12.90
Rsb1	-1.78	1.76	
Rspo2	-1.55	1.88	
Serpinb2	-1.66		-4.39
Sfrp4	-1.99	1.93	-6.40
Siah1b	-1.54	1.64	
Slc7a8	-2.36	2.09	-1.69
Spin1	-2.81	1.56	
Tcl1b1	-1.93	1.91	
Tiparp	-2.00	1.66	-1.63
Tnfrsf6	-2.27	6.65	-10.01
Zfp804a	-1.68		-3.50
Znrf2	-1.63		-2.03

Genes listed are downregulated following 18 hours of *Yap1/Taz* knockdown in GCs, and meet one of the two following criteria: 1) upregulated in WT GCs stimulated 3 hours with LH, or 2) downregulated in *Erk1/2*-deficient GCs isolated 2.5 hours after hCG stimulation. Genes are listed in alphabetical order. Fold change (FC) is expressed as a ratio between the treatment (Ad-Cre, LH, *Erk1/2* depleted GCs) and its respective control (Ad-eGFP, PBS, WT GCs). Oocyte-specific genes were excluded from this list as their presence was likely caused by oocyte contamination of our primary GC culture. Cut-off thresholds of  $P \leq 0.05$  and  $|FC| \geq 1.5$  were used to identify differentially expressed genes.

## 4.11 Tableaux supplémentaires

**Tableau S1.** – Primer sequences for quantitative PCR

Primer	Forward sequence (5' to 3')	Reverse sequence (5' to 3')
-2700 Areg TSS	ACATGTAATGCTCCCTTCCCAG	TCTGTTTGAAGTAAAAGTTGGCTGT
-2100 Areg TSS	AATGAAACCTGTGAGACTCGGA	GGCAATCTGCTTACAGGGCT
-1600 Areg TSS	CAAACATGGTGCTGCTCACT	GTCCTGAACTGTGCCCTCAC
-520 Areg TSS	GAGCACACTTATCCCCAGCA	GCCAGACAGTGGCACTTAGG
-330 Areg TSS	GGAGTCCTTTAGCGCTTCGT	TGGCTTAGTGATGTTAGCCCC
-150 Areg TSS	ACAACGCGAGTGGGAAAGTT	TGGGGATCGAGCCCTGATTA
-50 Areg TSS	AAGTTTCTCCCCGCGTAATCA	GCGGGAGGTTACTACTCCAAA
+40 Areg TSS	TTCCTTCGCTCCCTTCTGAC	TCAGGCTCAGCTGGAGATGT
+240 Areg TSS	GCCGGTGAACCAATGAGAA	CACCTGAGCCTAAGACCAGC
+370 Areg TSS	CCAAACGTCAGGGAGCAGAT	TCACCCTCCTAGCATGAGCA
Areg	CGAAATGCCTTCTGGCAGTG	GGCTTAATCACCTGTTCAACTCTG
Birc5	TCATCCACTGCCCTACCGAG	CAGGGGAGTGCTTTCTATGCT
Birc7	TCTCCATAGTCTTCGTGCC	AGGAATGTGCGTACACAGCTA
Btc	GCATCCATGGGAGATGCCGCTT	ACCACTATCAAGCAGACCACCAGG
Ccn1	TTGACCAGACTGGCGCTCT	AGTTTTGCTGCAGTCCTCGT
Ccn2	GGAAAACATTAAGAAGGGCAAAA	CCGCAGAACTTAGCCCTGTA
Ccn3	AGAGTTGTTCTGAGATGAGACCC	CCCTCTGGAACCATGCAAATG
Ccn5	CTCAGCCCAAGGACACCAA	GGATACTCGGGTGGCTATGC
Ccn6	CGTGTGCGCATATCTTGTTGG	GTGGGGCTGAAATACTTGGC
Egfr (ErbB1)	TCTGGAAACCGAAATTTGTGCTA	ACGGCCTTGCAGTCTTTCTC
Ereg	CAAGCAGTAGCCGTCCATGT	ACTGTACCGCCTTAGTTCAGA
Lats1	AGCAGCACGTAGAGAACGTC	TCTCATTTGATCCTGGGCATCT
Lats2	TGCACTGGATTCAGGTGGACTCA	GAGAATGTGCCAGGCACCTCT
Lhcgr	GCTGGAGTCCATTAGACGCTCA	AGCATCTGGTTCTGGAGTACATTG
Pgr	TCCAGGTGACCCATGAGGAA	TTGCCTTGATCAATTCGCGG
Ptgs2	CCTGAAGCCGTACACATCATTGTA	AGGCACTTGCAATTGATGGTGGCT
Taz	ACTGGCCAGAGATACTTCCTTAATC	AGGCTGATTCATCACCTTCCTG
Tead1	CCTGGCTATCTATCCGCCGT	CCCGTTCTGAGTTTGATGTATCT
Tead2	ACCATCCTCCAGGTTGTGAC	CCTCGTTCACTGGTGGAGAC
Tead3	GCATTAAGGCTATGAACCTGGAC	TTTGGGCAGACGACATGGAT
Tead4	GGTGTATGGAGCCCCGAAAT	CGATCAGTCTATTCCGACCATA
Tnfaip6	TGAAGGTGGTCGTCTCGCAACC	TCCACAGTTGGGCCAGGTTTCA
Yap1	GACGCTGATGAATTCTGCCTCA	CATGGCAAACGAGGGTCC

**Tableau S2.** – Enriched Gene-Ontology Biological Processes of genes that were both downregulated in *Yap1/Taz* deficient GCs and upregulated in WT GCs in response to LH

	<b>GO Biological Process</b>	<b># genes</b>	<b>% of GO BP</b>	<b>P-value</b>
<b>Metascape</b>				
	ovulation	5	11.11	1.91E-09
	cell migration involved in sprouting	4	8.89	5.13E-06
	surfactant homeostasis	3	6.67	2.63E-05
	female gonad development	4	8.89	1.20E-04
	platelet-derived growth factor	3	6.67	3.55E-04
	regulation of cell-matrix adhesion	3	6.67	2.63E-03
<b>DAVID</b>				
	positive regulation of ovulation	3	6	3.00E-05
	ovulation	3	6	2.70E-04
	multicellular organism development	9	18	1.90E-03
	angiogenesis	5	10	2.10E-03
	positive regulation of cell migration	4	8	1.10E-02
	smooth muscle cell migration	2	4	1.80E-02

The top 6 (based on P-value) biological processes identified with both the Metascape and DAVID bioinformatic software are listed. For each biological process, the number of corresponding genes in the analysis, the percentage of the biological process that these genes represent, and the P-value of the enrichment are indicated. GO = Gene-Ontology. BP = Biological Process.

**Tableau S3.** – Enriched Gene-Ontology Biological Processes of genes that were downregulated in both *Yap1/Taz* deficient and *Erk1/2* deficient GCs isolated 2.5 hours after hCG

	<b>GO Biological Process</b>	<b># genes</b>	<b>% of GO BP</b>	<b>P-value</b>
<b>Metascape</b>				
	vasculature development	10	31.25	1.78E-07
	regulation of cell adhesion	9	28.12	1.70E-06
	transmembrane receptor protein	8	25	2.63E-06
	negative regulation of cell population	8	25	1.51E-05
	positive regulation of cell migration	7	21.88	2.04E-05
	regulation of cell-substrate adhesion	5	15.62	2.24E-05
<b>DAVID</b>				
	ovulation	3	9.4	1.50E-04
	positive regulation of protein catabolic	3	9.4	4.40E-03
	positive regulation of cell migration	4	12.5	4.50E-03
	angiogenesis	4	12.5	7.10E-03
	positive regulation of smooth muscle	3	9.4	7.80E-03
	pulmonary artery morphogenesis	2	6.2	8.30E-03

The top 6 (based on P-value) biological processes identified with both the Metascape and DAVID bioinformatic software are listed. For each biological process, the number of corresponding genes in the analysis, the percentage of the biological process that these genes represent, and the P-value of the enrichment are indicated. GO = Gene-Ontology. BP = Biological Process.

## **Chapitre 5 – Discussion**

## **5.1 Discussion générale**

### **5.1.1 Recherche fondamentale et santé humaine**

La recherche biomédicale a pour but de faire évoluer nos connaissances dans le domaine de la santé à un niveau inatteignable simplement par l'expérience clinique. Elle a comme objectif de mieux décrire les systèmes biologiques dans le but d'utiliser les connaissances acquises pour améliorer la santé ou la qualité de vie de sujets animaux ou humains. La souris est un modèle animal bien caractérisé qui est fréquemment utilisé dans le but de modéliser des maladies humaines. La recherche biomédicale est à l'origine de nombreuses avancées cruciales en médecine telles que la découverte de l'insuline, l'identification des groupes sanguins, ainsi que le développement de vaccins, d'antibiotiques et de la pilule contraceptive. La portion fondamentale de la recherche biomédicale, telle que pratiquée dans le laboratoire du Dr Boerboom, cherche à caractériser les interactions moléculaires et cellulaires d'un système biologique. Ce type de recherche possède l'avantage de modéliser un système à son plus petit niveau d'organisation et de permettre ainsi l'identification d'interactions moléculaires précises à l'échelle du protéome et du génome. Ce niveau de détail est essentiel à notre compréhension des processus pathologiques et au développement de stratégies thérapeutiques d'intervention efficaces.

### **5.1.2 Recherche dans l'ovaire**

Étant donné le rôle central de l'ovaire dans la régulation de la reproduction chez la femme, son étude présente un intérêt particulier. La poursuite des investigations de la physiologie ovarienne pourrait permettre des avancées notables dans notre compréhension de plusieurs phénomènes physiologiques et dans notre capacité de traitement de plusieurs conditions pathologiques. Les plus importantes sont résumées dans le Tableau 1. Contrairement aux gonadotrophines et à leurs récepteurs dont l'étude a débuté il y a maintenant plus d'un demi-siècle, la voie Hippo est un acteur nouvellement identifié dans la physiologie ovarienne. Fort des avancées dans la description du rôle de la voie développementale Wnt dans la physiologie ovarienne (Abedini et al., 2016; Boyer et al., 2010; Laguë et al., 2008; Lapointe et al., 2012; Richards et al., 2012; Zamberlam et al., 2019) et de son expérience dans l'utilisation de modèles

murins transgéniques, le laboratoire Boerboom s'est intéressé à l'implication de la voie embryonnaire Hippo dans l'ovaire dans la dernière décennie.

**Tableau 1.** – Thématiques de recherche dans l'ovaire

<b>Processus biologiques</b>	<b>Thématique de recherche</b>
Activation des follicules primordiaux	Insuffisance ovarienne prématurée Préservation de la fertilité durant un traitement chimiothérapeutique
Croissance antrale et sélection	Contrôle du cycle estral chez espèces d'élevage Stimulation ovarienne (fécondation in vitro)
Ovulation	Contraception
Physiologie du corps jaune	Insuffisance lutéale
Pathologies	Cancer ovarien Syndrome des ovaires polykystiques
<b>Questionnements physiologiques fondamentaux</b>	
Existe-t-il des espèces mammaliennes pour lesquelles l'ovogenèse postnatale contribue à la folliculogénèse?	
Quels mécanismes régulent l'activation continue d'un nombre limité, mais suffisant de follicules primordiaux durant la période reproductive?	
Est-il possible de stopper l'activation folliculaire afin de retarder la ménopause chez la femme?	
Qu'est-ce qui régule l'ovulation d'un seul ovocyte par cycle chez la femme (ou d'un nombre limité chez les espèces poly-ovulatoires)?	

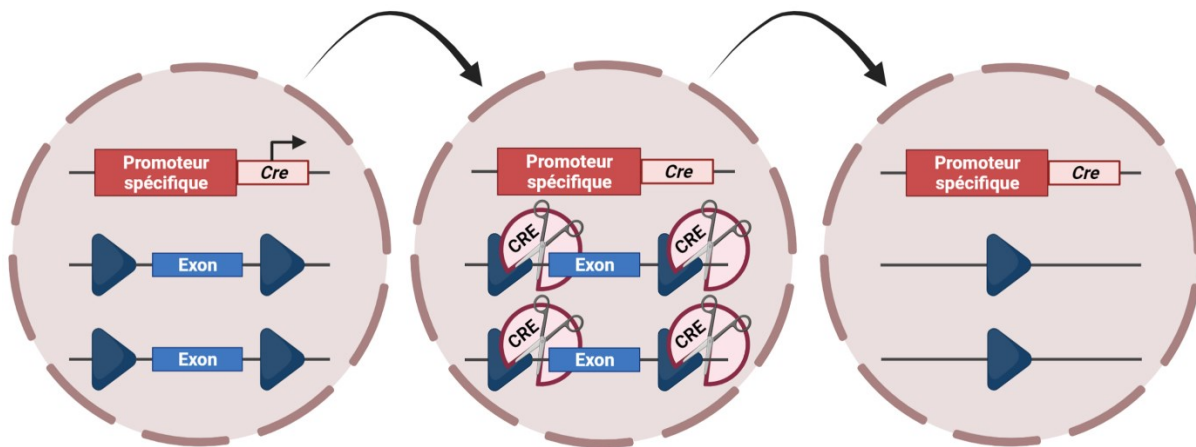
### **5.1.3 Système de recombinaison Cre-LoxP**

Le système de recombinaison Cre-LoxP permet de supprimer l'expression d'un gène dans un tissu spécifique à un temps défini du développement. Il s'agit d'un système découvert chez le bactériophage P1 dans les années 1980 (Sternberg et Hamilton, 1981) qui a été ensuite adapté pour permettre son utilisation dans les systèmes mammaliens. Son utilisation est très répandue chez la souris pour étudier la fonction des gènes.

En bref, le système nécessite la présence de sites LoxP (séquences de 34 paires de bases) dans le génome de l'animal. Habituellement, les sites LoxP sont situés de part et d'autre d'un exon essentiel à la fonction d'un gène d'intérêt (Figure 14). L'enzyme CRE, codée par le transgène



*Cre* (*cyclic recombinase*) reconnaît les sites LoxP et supprime le matériel génétique entre les deux. Le système a tout son intérêt du fait que l'expression de *Cre* est dépendante de l'activité d'un promoteur spécifique au type cellulaire d'intérêt. Il suffit de croiser cette souche murine avec une souche possédant les sites LoxP au pourtour de notre gène d'intérêt afin de créer notre modèle murin transgénique de notre étude.



**Figure 14.** – Système de recombinaison Cre-LoxP

Dans les cellules transgéniques pour lesquelles le promoteur couplé à la *Cre* est actif (à gauche), l'enzyme CRE (icône de ciseaux, au centre) est traduite. Elle reconnaît ensuite une paire de sites LoxP (triangles bleus) situés de part et d'autre de la séquence génétique à éliminer et excise l'ADN (un exon dans cet exemple) entre les deux.

Dans l'optique d'étudier les rôles spécifiques de *Yap1/Taz* dans l'ovaire, nous avons utilisé des souches murines dont l'expression de *Cre* est dépendante des promoteurs du gène *Cyp19a1* et du gène *Amhr2*. *Cyp19a1* est exprimé dans les CGs, exclusivement durant le stade antral de la folliculogénèse (Fan, Liu, Cahill et Richards, 2008). Quant à lui, *Amhr2* est exprimé dans les CGs à partir du stade secondaire (Jorgez et al., 2004). Il s'agit de deux modèles d'investigation de l'ovaire fréquemment utilisés dans la littérature. Nous avons donc de grands espoirs de pouvoir élucider certains rôles de *Yap1/Taz* dans les différentes étapes du développement folliculaire. Malheureusement, les souris générées exprimaient des niveaux de *Yap1/Taz* dans l'ovaire comparables à ceux des femelles contrôles. Le modèle *Cyp19a1-cre* s'est avéré totalement inefficace, tandis que le modèle *Amhr2-cre* a entraîné la délétion de nos gènes d'intérêt

exclusivement dans l'oviducte. De manière similaire, Lv et al. ne sont pas parvenus à supprimer significativement l'expression de YAP1 dans les CGs avec le modèle *Cyp19a1-cre* (Lv et al., 2019).

L'absence d'un phénotype ovarien dans nos modèles pourrait s'expliquer par une plus grande proportion de cellules avec une expression normale de *Yap1/Taz* avec le temps. En effet, il est possible que la recombinaison ne soit survenue que dans une faible proportion de CGs et que celles-ci soient entrées en apoptose. Aussi, puisque *Yap1/Taz* sont impliqués dans la prolifération des CGs (Ji et al., 2017), il est possible que les cellules avec une expression normale de *Yap1/Taz* aient tout simplement supplanté en nombre les cellules déficientes durant la croissance folliculaire. Ces mécanismes peuvent expliquer les niveaux protéiques et en ARNm de *Yap1/Taz* inaltérés dans les ovaires de nos modèles transgéniques.

Une autre hypothèse concerne des modifications au niveau de la chromatine. Afin que l'enzyme CRE puisse couper le matériel génétique, elle doit être en mesure de reconnaître les sites LoxP. Il est possible que la condensation de la chromatine au niveau des gènes *Yap1/Taz* n'ait permis aucun accès aux sites LoxP. Ce type de phénomène a été proposé pour expliquer l'inactivité de la CRE dans les cellules satellites musculaires (Brack, 2014). Il a aussi été démontré que les modifications épigénétiques peuvent influencer l'efficacité de la recombinaison de la CRE (Long et Rossi, 2009). Toutefois, puisque la condensation de la chromatine et la méthylation de l'ADN sont normalement indicateurs de l'inactivation génique et que *Yap1/Taz* sont exprimés dans les CGs des follicules en croissance (Kawamura et al., 2013; Sun et al., 2015), ces hypothèses apparaissent moins plausibles que la précédente.

Malgré le fait que le système Cre-LoxP n'a pas permis la génération d'un modèle murin de délétion génique de *Yap1/Taz* dans l'ovaire, il a permis l'étude du rôle de la voie Hippo dans l'oviducte. Nous avons modifié notre méthodologie initiale afin de pouvoir étudier le rôle de la voie Hippo dans l'oviducte et dans la physiologie des CGs in vitro. Ces ajustements ont permis à cette thèse de contribuer substantiellement à la recherche fondamentale de la voie Hippo dans le tractus reproducteur femelle chez la souris.

## 5.2 Premier article

### 5.2.1 Limitations et défis

L'expression de *Cre* dès le jour embryonnaire 14,5 dans le modèle *Amhr2-cre* (Jamin et al., 2002) combinée à l'apparition macroscopique des défauts de l'oviducte seulement à l'âge adulte rend l'investigation d'un tel phénotype progressif ardue. Il est plus complexe d'identifier le stade du développement où l'intégrité de la voie Hippo a une importance capitale. L'expression de YAP1/TAZ dans le mésenchyme des canaux de Müller est-elle seulement nécessaire lors de l'embryogenèse? Leur délétion uniquement durant les premiers jours de vie lors de la différenciation du mésenchyme en cellules musculaires est-elle suffisante pour engendrer un tel phénotype? De plus, l'intégrité de la voie Hippo est-elle nécessaire dans l'homéostasie du tissu adulte? Pour être en mesure de répondre à ces questions, il faudrait employer un système qui permet la délétion *in vivo* de *Yap1/Taz* dans les cellules musculaires lisses de l'oviducte à des moments spécifiques de la vie de l'animal. Il existe des modèles transgéniques murins pour lesquels l'activité de la CRE est dépendante d'une substance exogène. Le modèle le plus fréquemment utilisé est celui dépendant de l'administration de tamoxifène. Comme dans un système Cre-LoxP normal (non inductible), un promoteur spécifique dirige l'expression de *Cre*. Toutefois, l'enzyme ne peut transloquer dans le noyau qu'en présence de tamoxifène dans ce système inductible (Kim, Kim, Im et Fang, 2018). Cela permet la délétion des gènes d'intérêt au moment de l'injection de tamoxifène par le manipulateur et correspondant donc aux objectifs précis de l'étude. Toutefois, dans le cadre de l'étude spécifique du myosalpinx, il n'existe pas de promoteur qui permettrait l'expression de *Cre* à ce tissu uniquement. Les modèles *Amhr2*<sup>em1(cre/ERT2)Smoc</sup> et *Acta2*<sup>em1(cre/ERT2)Smoc</sup> existent (identifiants de la base de données MGI 6514759 et 6430180), mais risqueraient d'entraîner l'atteinte du stroma et de la musculature utérins ou de toutes les cellules musculaires lisses de l'organisme, respectivement.

La plus grande difficulté rencontrée dans cette étude a été l'identification précise du mécanisme moléculaire impliqué dans l'apparition des défauts du myosalpinx secondaires à la délétion de *Yap1/Taz*. En se basant sur les rôles classiques de la voie Hippo dans d'autres tissus, il était logique de penser que leur perte pouvait engendrer des défauts dans la prolifération ou

l'apoptose des cellules musculaires lisses. Nous avons exploré ces possibilités sans succès. Toutefois, contrairement aux tissus épithéliaux, le myosalpinx possède un faible renouvellement (*turnover*) de ses cellules. Combiné au fait que le phénotype se développe sur une durée de plusieurs mois, il est possible que les techniques employées pour évaluer la prolifération et l'apoptose ne fussent pas suffisamment sensibles pour détecter une différence faible, mais significative. En effet, les techniques d'incorporation de BrdU, d'IHC de Ki-67 et de la caspase 3, ainsi que la détection de la fragmentation de l'ADN par TUNEL sont des techniques évaluant la prolifération ou l'apoptose à un moment précis. Elles ne sont pas en mesure de mettre en évidence une différence faible qui perdurerait pendant plusieurs semaines.

Présentement, il n'existe pas de lignées de cellules musculaires lisses de l'oviducte disponible sur le marché. De plus, il est complexe d'isoler ces cellules et de maintenir leurs caractéristiques identitaires en culture primaire. Dans l'éventualité où l'une de ces deux options avait été envisageable, il aurait été intéressant de supprimer l'expression de *Yap1/Taz* à l'aide de petits ARNs interférents afin d'examiner les changements moléculaires seulement quelques heures après leur délétion (contrairement à plusieurs semaines dans notre modèle *in vivo*). Un tel système *in vitro* aurait facilement permis l'identification des interactions moléculaires clés entre la voie Hippo et les effecteurs responsables du développement et du maintien des cellules musculaires lisses de l'oviducte.

## **5.2.2 Contribution à la recherche et perspectives**

Cette étude est la première à rapporter l'implication de la voie Hippo dans le développement des cellules musculaires lisses de l'oviducte. Bien qu'il s'agisse d'un tissu rarement impliqué dans des pathologies humaines importantes, cette trouvaille a tout de même des implications potentielles notables. Par exemple, la voie Hippo pourraient être impliquée dans la pathophysiologie des grossesses ectopiques. Cette condition médicale urgente, définie par une nidation embryonnaire dans un tissu autre que l'endomètre utérin, survient dans 1 à 2 % des grossesses humaines (Farquhar, 2005). L'oviducte est le lieu de nidation dans plus de 95% des cas (Rana et al., 2013). Les facteurs de risque ne sont pas tous identifiés, mais les grossesses ectopiques sont principalement secondaires à un prolongement du séjour de l'embryon dans

l'oviducte en raison d'un microenvironnement inadéquat ou d'une altération de la contractilité musculaire (Rana et al., 2013). Étant donné que nous avons démontré l'implication de Hippo dans la physiologie des cellules musculaires lisses de l'oviducte, elle constitue une voie dont le rôle dans cette condition médicale grave mérite d'être investigué.

Les cellules musculaires lisses sont impliquées dans la pathophysiologie de plusieurs autres tissus tels que les bronches dans l'asthme (Salter, Pray, Radford, Martin et Nair, 2017), les vaisseaux sanguins dans l'athérosclérose (Bennett, Sinha et Owens, 2016) et l'utérus dans les léiomyomes utérins (McWilliams et Chennathukuzhi, 2017). Puisque la voie Hippo a été démontrée comme étant impliquée dans l'homéostasie des cellules musculaires lisses de ces tissus (Fu, Zheng, et al., 2017; Kimura et al., 2016; St-Jean, Tsoi, et al., 2019), nos résultats peuvent apporter des nouvelles pistes de solution à leur étude dans des contextes autres que celui du transport embryonnaire.

Tel que mentionné à la [section 1.2.2.2](#), le mésenchyme des canaux de Müller est impliqué dans la différenciation de l'épithélium en période postnatale. Histologiquement, l'épithélium de l'isthme des jeunes femelles *Yap/Taz<sup>ff</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* présentait quelques cellules ciliées avec plusieurs cellules sécrétrices dans une proportion et une morphologie semblable aux contrôles. Toutefois, il est possible que leur développement et leur fonction fussent affectés par les défauts du mésenchyme. Puisque le transport embryonnaire dans l'ampoule est principalement effectué par le battement ciliaire (Halbert, Becker et Szal, 1989) et que les embryons atteignaient l'isthme sans problème, il est peu probable que la fonction ciliaire était affectée. L'épithélium de l'oviducte sécrète de nombreux facteurs impliqués dans la survie de l'embryon et dans son développement pré-implantatoire (Avilés, Gutiérrez-Adán et Coy, 2010). Ce champ de recherche n'est encore qu'à ses débuts, mais on ne peut exclure que la sécrétion de l'épithélium puisse être affectée dans notre modèle transgénique. Ainsi, il aurait été intéressant d'ajouter une analyse du sécrétome de l'oviducte dans l'analyse de notre modèle.

## 5.3 Second article

### 5.3.1 Limitations et défis

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé une approche *in vitro* pour étudier le rôle de la voie Hippo dans la physiologie ovarienne. La culture primaire de CGs combinée à des analyses de biologie moléculaire (western blot, RT-qPCR, puce à ADN) est couramment utilisée par notre laboratoire dans le but de caractériser les mécanismes moléculaires en cause. Le fait d'extraire des cellules de leur environnement biologique et de les cultiver peut toutefois entraîner des facteurs confondants. Par exemple, la voie Hippo est grandement influencée par plusieurs facteurs propres à la culture cellulaire comme les dommages mécaniques induits lors de l'isolation des cellules, la confluence, la présence de sérum dans le milieu et l'adhésion à une matrice rigide de plastique. Dans le but de contrôler certains de ces facteurs, nous avons effectué des expériences préliminaires afin de déterminer la densité cellulaire optimale et d'ajuster les paramètres liés au sérum (concentration, temps de traitement et de privation [*starving*]). D'autre part, il est bien connu que les CGs en culture ont tendance à se lutéiniser graduellement avec le temps, notamment par la présence de sérum dans le milieu de culture (Murphy, 2004). Pour cette raison, la culture prolongée de CGs primaires (nécessaire lors de l'utilisation d'adénovirus) peut entraîner une réponse physiologique plus faible au traitement subséquent à la LH. Notre système de culture primaire restreint au minimum le temps d'attache des cellules aux plaques de culture et le temps de traitement aux adénovirus afin de limiter les changements physiologiques des CGs. Aussi, nous nous assurons toujours que la réponse à la LH ou aux adénovirus soit robuste en vérifiant par exemple la phosphorylation de CREB ou les niveaux en ARNs messagers de *Yap1/Taz*. Pour ces raisons, et malgré toutes nos précautions, nos trouvailles sur les nombreuses interactions entre la voie Hippo et la cascade de signalisation de la LH devront éventuellement être vérifiées dans un modèle *in vivo*.

Une autre problématique liée à la culture primaire est la quantité limitée de matériel qu'il est possible d'utiliser pour chaque expérience. Au départ, nous avons prévu effectuer l'expérience d'immunoprécipitation de la chromatine avec des CGs primaires *Yap1/Taz*<sup>fl/fl</sup> traitées avec l'adénovirus-cre (GFP comme contrôle) avec ou sans LH par la suite (PBS comme contrôle).

Le but aurait été de mettre en évidence le recrutement des co-régulateurs de la voie Hippo dans le promoteur d'*Areg* en réponse au traitement LH et une absence de recrutement lors de leur délétion. Toutefois, malgré plusieurs essais et une augmentation maximale de la quantité de matériel de départ, nous ne sommes pas parvenus à optimiser ce système. Afin de contrer cette limitation liée à la quantité de matériel disponible, nous avons tenté d'utiliser une lignée de CGs (GRM02). L'idée était de supprimer l'expression de *Yap1/Taz* à l'aide de petits ARNs interférents et d'effectuer la même analyse de ChIP-qPCR par la suite. Malheureusement, certains problèmes techniques liés à la culture des cellules dans notre laboratoire n'ont pu permettre de mener cette alternative à terme. Finalement, nous avons utilisé des CGs de souris de type sauvage fraîchement récoltées avant ou après 60 minutes d'hCG. La quantité de cellules étant toutefois limitée même avec ce système, nous avons décidé de concentrer nos efforts dans l'évaluation de YAP1 et omis volontairement TAZ.

### 5.3.2 Contribution à la recherche et perspectives

Un des plus grands obstacles à l'étude de la voie Hippo est l'absence d'activateur spécifique de la voie qui serait conservé dans tous les contextes cellulaires. Comme vu dans la [section 2.3](#), plusieurs régulateurs peuvent être responsables de son activation. Nous sommes parvenus à démontrer que l'activation de la voie Hippo en période péri-ovulatoire survient à la suite de l'activation de LHCGR, un récepteur couplé à une protéine G. Cela n'exclut toutefois pas l'implication d'autres composants dans sa régulation durant l'ovulation.

Un autre aspect essentiel à l'étude de la voie Hippo dans un nouveau système est l'identification des cibles transcriptionnelles qui lui sont propres. Nos résultats ont permis de consolider la place d'*Areg* en tant que gène cible de la voie Hippo en démontrant pour la première fois sa régulation transcriptionnelle directe dans les CGs.

Une perspective intéressante de recherche supplémentaire de la voie Hippo dans l'ovulation concerne la régulation du gène *Ptgs2*. Nous avons démontré qu'en l'absence d'expression de *Yap1/Taz*, son induction en réponse à un traitement à la LH est réduite. *Ptgs2* a été précédemment identifié comme une cible transcriptionnelle directe de YAP1 dans des lignées cellulaires cancéreuses pulmonaires (Zhang et al., 2018) et hépatiques (Xu, Wang, et al., 2018)

humaines. Considérant que l'expression adéquate de *Ptgs2* est un élément clé dans l'expansion du cumulus et dans la rupture folliculaire ([sections 1.3.3.3](#) et [1.3.3.4](#)), il serait intéressant d'évaluer si YAP1 contribue directement à sa régulation en réponse au signal ovulatoire.

La poursuite de la caractérisation du rôle de la voie Hippo dans l'ovulation serait possiblement bénéfique dans plusieurs domaines d'études en médecine de la reproduction. Par exemple, il a été rapporté que certains polymorphismes nucléotidiques du gène *Yap1* sont associés au développement du syndrome des ovaires polykystiques (Li, Zhao, et al., 2012). Ce syndrome se caractérise par la persistance anormale de plusieurs follicules qui ne parviennent pas à libérer leur ovocyte et est une cause majeure d'anovulation chez la femme. Récemment, il a été rapporté que l'expression de *Yap1/Taz* et de leurs gènes cibles *Ccn1*, *Ccn2* et *Birc5* dans les CGs bovines est plus élevée dans follicules kystiques que dans les gros follicules antraux (Dos Santos, St-Jean, Boyer, Price et Zamberlam, 2021). Bien qu'il n'existe toujours pas de preuve directe de l'implication de la voie Hippo dans la physiopathologie du développement des kystes folliculaires dans la littérature, il est vraisemblable qu'elle puisse y avoir un rôle à jouer.

L'élucidation des mécanismes de régulation de la voie Hippo pourrait aussi s'avérer bénéfique dans le domaine de la procréation assistée. Il est présentement estimé que plus de 8 millions d'enfants sont nés grâce à la fécondation in vitro (FIV) ou à d'autres techniques de procréation assistée depuis la première réussite de cette technologie en 1978 (Crawford et Ledger, 2019). Afin de maximiser la réussite d'un cycle de FIV, la patiente reçoit une stimulation ovarienne qui permet la croissance et la maturation de plusieurs follicules jusqu'au stade pré-ovulatoire. Malheureusement, malgré l'ajustement possible dans la posologie et les gonadotrophines employées pour la stimulation ovarienne (Nargund, Datta et Fauser, 2017), les protocoles utilisés peuvent encore s'avérer inefficaces et même parfois dangereux chez un certain nombre de femmes. Le syndrome d'hyperstimulation ovarienne est une condition iatrogénique secondaire à la stimulation ovarienne qui survient dans 20-30% des cycles de FIV et qui comprend un haut taux de morbidité (Timmons, Montrief, Koyfman et Long, 2019). Une meilleure caractérisation des effecteurs impliqués dans la signalisation des gonadotrophines permettrait l'identification de nouvelles cibles intéressantes de modulation de cette cascade dans l'espoir de développer des protocoles de stimulation ovarienne plus efficaces et plus sécuritaires.



## **Chapitre 6 – Conclusion**

À ce jour, plusieurs questionnements centraux dans l'étude de la physiologie de l'ovaire et du tractus reproducteur femelle restent encore à être élucidés. La voie de signalisation Hippo pourrait s'avérer en être un acteur incontournable compte tenu de l'accumulation des trouvailles appuyant son implication dans plusieurs processus biologiques en lien avec la reproduction.

De manière imprévue, ce projet de thèse a permis une exploration de l'implication de la voie Hippo dans l'oviducte, un organe parfois sous-estimé, mais essentiel à la fertilité. Ce projet a aussi contribué significativement à la littérature scientifique dans l'ovulation en précisant les interactions entre la voie Hippo et certains effecteurs clés tels que l'amphiréguline et les voies PKA/CREB et ERK1/2.

Poursuivre la recherche biomédicale avec l'objectif de toujours mieux caractériser les interactions moléculaires intervenants dans la physiologie ovarienne s'avère indispensable afin de dresser une image de plus en plus nette d'un tel système. Il s'ensuit alors une meilleure compréhension des processus pathologiques à l'origine de l'infertilité féminine et, par le fait même, ouvre la voie à des nouvelles stratégies thérapeutiques de stimulation ovarienne toujours plus efficaces et plus sécuritaires.

## Références bibliographiques

- Abbassi, L., Malki, S., Cockburn, K., Macaulay, A., Robert, C., Rossant, J. et Clarke, H. J. (2016). Multiple Mechanisms Cooperate to Constitutively Exclude the Transcriptional Co-Activator YAP from the Nucleus During Murine Oogenesis. *Biology of Reproduction*, *94*(5), 102. doi: 10.1095/biolreprod.115.137968
- Abedini, A., Zamberlam, G., Lapointe, E., Tourigny, C., Boyer, A., Paquet, M., . . . Boerboom, D. (2016). WNT5a is required for normal ovarian follicle development and antagonizes gonadotropin responsiveness in granulosa cells by suppressing canonical WNT signaling. *FASEB Journal*, *30*(4), 1534-1547. doi: 10.1096/fj.15-280313
- Abel, M. H., Wootton, A. N., Wilkins, V., Huhtaniemi, I., Knight, P. G. et Charlton, H. M. (2000). The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology*, *141*(5), 1795-1803. doi: 10.1210/endo.141.5.7456
- Ackert, C. L., Gittens, J. E. I., O'Brien, M. J., Eppig, J. J. et Kidder, G. M. (2001). Intercellular Communication via Connexin43 Gap Junctions Is Required for Ovarian Folliculogenesis in the Mouse. *Developmental Biology*, *233*(2), 258-270. doi: 10.1006/dbio.2001.0216
- Adhikari, D., Flohr, G., Gorre, N., Shen, Y., Yang, H., Lundin, E., . . . Liu, K. (2009). Disruption of Tsc2 in oocytes leads to overactivation of the entire pool of primordial follicles. *Molecular Human Reproduction*, *15*(12), 765-770. doi: 10.1093/molehr/gap092
- Adhikari, D. et Liu, K. (2014). The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *382*(1), 480-487. doi: 10.1016/j.mce.2013.07.027
- Adhikari, D., Zheng, W., Shen, Y., Gorre, N., Hämäläinen, T., Cooney, A. J., . . . Liu, K. (2010). Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Human Molecular Genetics*, *19*(3), 397-410. doi: 10.1093/hmg/ddp483
- Ajayi, A. F. et Akhigbe, R. E. (2020). Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertility Research and Practice*, *6*(1), 5. doi: 10.1186/s40738-020-00074-3

- Ardestani, A., Lupse, B. et Maedler, K. (2018). Hippo Signaling: Key Emerging Pathway in Cellular and Whole-Body Metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 29(7), 492-509. doi: 10.1016/j.tem.2018.04.006
- Ardestani, A. et Maedler, K. (2017). The Hippo Signaling Pathway in Pancreatic  $\beta$ -Cells: Functions and Regulations. *Endocrine Reviews*, 39(1), 21-35. doi: 10.1210/er.2017-00167
- Arrigoni, L., Richter, A. S., Betancourt, E., Bruder, K., Diehl, S., Manke, T. et Bönisch, U. (2016). Standardizing chromatin research: a simple and universal method for ChIP-seq. *Nucleic Acids Research*, 44(7), e67. doi: 10.1093/nar/gkv1495
- Attardi, B. et Miklos, J. (1990). Rapid Stimulatory Effect of Activin-A on Messenger RNA Encoding the Follicle-Stimulating Hormone  $\beta$ -Subunit in Rat Pituitary Cell Cultures. *Molecular Endocrinology*, 4(5), 721-726. doi: 10.1210/mend-4-5-721
- Avilés, M., Gutiérrez-Adán, A. et Coy, P. (2010). Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Molecular Human Reproduction*, 16(12), 896-906. doi: 10.1093/molehr/gaq056
- Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., . . . Piccolo, S. (2014). YAP/TAZ incorporation in the beta-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell*, 158(1), 157-170. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.013
- Bae, J. S., Kim, S. M. et Lee, H. (2016). The Hippo signaling pathway provides novel anti-cancer drug targets. *Oncotarget*, 8(9), 16084-16098. doi: 10.18632/oncotarget.14306
- Bae, S. J., Ni, L., Osinski, A., Tomchick, D. R., Brautigam, C. A. et Luo, X. J. E. (2017). SAV1 promotes Hippo kinase activation through antagonizing the PP2A phosphatase STRIPAK. *6*. doi: 10.7554/eLife.30278.001
- Balen, A. H. (2014). *Infertility in practice*. CRC Press.
- Barreto, S. C., Ray, A. et Ag Edgar, P. J. J. B. (2016). Biological characteristics of CCN proteins in tumor development. *21(6)*, 1359-1367.
- Barry, E. R., Simov, V., Valtingoer, I. et Venier, O. (2021). Recent Therapeutic Approaches to Modulate the Hippo Pathway in Oncology and Regenerative Medicine. *Cells*, 10(10). doi: 10.3390/cells10102715

- Bennett, M. R., Sinha, S. et Owens, G. K. (2016). Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation Research*, 118(4), 692-702. doi: 10.1161/circresaha.115.306361
- Bertolin, K. et Murphy, B. D. (2014). Reproductive tract changes during the mouse estrous cycle (*The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy* (p. 85-94): Elsevier.
- Boyer, A., Lapointe, É., Zheng, X., Cowan, R. G., Li, H., Quirk, S. M., . . . Boerboom, D. (2010). WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility. *The FASEB Journal*, 24(8), 3010-3025. doi: 10.1096/fj.09-145789
- Brack, A. S. (2014). Pax7 is back. *Skeletal Muscle*, 4(1), 24. doi: 10.1186/s13395-014-0024-4
- Breen, S. M., Andric, N., Ping, T., Xie, F., Offermans, S., Gossen, J. A. et Ascoli, M. (2013). Ovulation involves the luteinizing hormone-dependent activation of G(q/11) in granulosa cells. *Molecular Endocrinology*, 27(9), 1483-1491. doi: 10.1210/me.2013-1130
- Brelje, T. C. et Sorenson, R. L. (2021). Histology Guide. Chapter 18 - Female Reproductive System. Repéré à <https://histologyguide.com/slideview/MHS-259-ovary/18-slide-1.html>
- Brennan, J. et Capel, B. (2004). One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 509-521. doi: 10.1038/nrg1381
- Brody, J. R. et Cunha, G. R. (1989). Histologic, morphometric, and immunocytochemical analysis of myometrial development in rats and mice: I. Normal development. *American Journal of Anatomy*, 186(1), 1-20. doi: 10.1002/aja.1001860102
- Brown, H. M., Dunning, K. R., Robker, R. L., Boerboom, D., Pritchard, M., Lane, M. et Russell, D. L. (2010). ADAMTS1 Cleavage of Versican Mediates Essential Structural Remodeling of the Ovarian Follicle and Cumulus-Oocyte Matrix During Ovulation in Mice<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 83(4), 549-557. doi: 10.1095/biolreprod.110.084434
- Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L. et Taft, R. A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One*, 7(4), e35538. doi: 10.1371/journal.pone.0035538
- Cacioppo, J. A., Lin, P. P., Hannon, P. R., McDougale, D. R., Gal, A. et Ko, C. (2017). Granulosa cell endothelin-2 expression is fundamental for ovulatory follicle rupture. *Scientific Reports*, 7(1), 817. doi: 10.1038/s41598-017-00943-w

- Cai, J., Zhang, N., Zheng, Y., De Wilde, R. F., Maitra, A., Pan, D. J. G. et al. (2010). The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *24*(21), 2383-2388.
- Cai, X., Wang, K. C. et Meng, Z. (2021). Mechanoregulation of YAP and TAZ in Cellular Homeostasis and Disease Progression. *Front Cell Dev Biol*, *9*, 673599. doi: 10.3389/fcell.2021.673599
- Calogero, A. E., Burrello, N., Ossino, A. M., Polosa, P. et D'Agata, R. (1998). Activin-A stimulates hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release by the explanted male rat hypothalamus: interaction with inhibin and androgens. *Journal of Endocrinology*, *156*(2), 269-274. doi: 10.1677/joe.0.1560269
- Canada, A. d. l. s. p. d. (2019). Fertilité. Repéré à <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/fertilite/fertilite.html>
- Carabatsos, M. J., Sellitto, C., Goodenough, D. A. et Albertini, D. F. J. D. b. (2000). Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *226*(2), 167-179.
- Carroll, T. J., Park, J. S., Hayashi, S., Majumdar, A. et McMahon, A. P. (2005). Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Developmental Cell*, *9*(2), 283-292. doi: 10.1016/j.devcel.2005.05.016
- Castrillon, D. H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J. W. et DePinho, R. A. (2003). Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*, *301*(5630), 215-218. doi: 10.1126/science.1086336
- Cha, B., Moon, S. et Kim, W. (2021). A novel role of Hippo-Yap/TAZ signaling pathway in lymphatic vascular development. *BMB Rep*, *54*(6), 285-294. doi: 10.5483/BMBRep.2021.54.6.020
- Chan, E. H. Y., Nousiainen, M., Chalamalasetty, R. B., Schäfer, A., Nigg, E. A. et Silljé, H. H. W. (2005). The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene*, *24*(12), 2076-2086. doi: 10.1038/sj.onc.1208445

- Chassot, A. A., Bradford, S. T., Auguste, A., Gregoire, E. P., Pailhoux, E., de Rooij, D. G., . . . Chaboissier, M. C. (2012). WNT4 and RSPO1 together are required for cell proliferation in the early mouse gonad. *Development*, *139*(23), 4461-4472. doi: 10.1242/dev.078972
- Chaulk, S. G., Lattanzi, V. J., Hiemer, S. E., Fahlman, R. P. et Varelans, X. (2014). The Hippo pathway effectors TAZ/YAP regulate dicer expression and microRNA biogenesis through Let-7. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(4), 1886-1891. doi: 10.1074/jbc.C113.529362
- Chen, B. et Liu, G. (2018). WWC3 inhibits intimal proliferation following vascular injury via the Hippo signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, *17*(4), 5175-5183. doi: 10.3892/mmr.2018.8484
- Chen, H., Song, Y., Yang, S., Fu, J., Feng, X. et Huang, W. (2017). YAP mediates human decidualization of the uterine endometrial stromal cells. *Placenta*, *53*, 30-35. doi: 10.1016/j.placenta.2017.03.013
- Chen, X., Li, Y., Luo, J. et Hou, N. (2020). Molecular Mechanism of Hippo-YAP1/TAZ Pathway in Heart Development, Disease, and Regeneration. *Frontiers in Physiology*, *11*, 389. doi: 10.3389/fphys.2020.00389
- Cheng, Y., Feng, Y., Jansson, L., Sato, Y., Deguchi, M., Kawamura, K. et Hsueh, A. J. (2015). Actin polymerization-enhancing drugs promote ovarian follicle growth mediated by the Hippo signaling effector YAP. *FASEB Journal*, *29*(6), 2423-2430. doi: 10.1096/fj.14-267856
- Cheng, Y., Kawamura, K., Takae, S., Deguchi, M., Yang, Q., Kuo, C. et Hsueh, A. J. (2013). Oocyte-derived R-spondin2 promotes ovarian follicle development. *FASEB Journal*, *27*(6), 2175-2184. doi: 10.1096/fj.12-223412
- Chin, E. C. et Abayasekara, D. R. (2004). Progesterone secretion by luteinizing human granulosa cells: a possible cAMP-dependent but PKA-independent mechanism involved in its regulation. *Journal of Endocrinology*, *183*(1), 51-60. doi: 10.1677/joe.1.05550
- Cho, W. K., Stern, S. et Biggers, J. D. J. J. o. E. Z. (1974). Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *187*(3), 383-386.
- Chun, S. Y., Eisenhauer, K. M., Minami, S., Billig, H., Perlas, E. et Hsueh, A. J. (1996). Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*, *137*(4), 1447-1456. doi: 10.1210/endo.137.4.8625923

- Combelles, C. M., Carabatsos, M. J., Kumar, T. R., Matzuk, M. M. et Albertini, D. F. (2004). Hormonal control of somatic cell oocyte interactions during ovarian follicle development. *Molecular Reproduction and Development*, 69(3), 347-355. doi: 10.1002/mrd.20128
- Cooke, P. S., Spencer, T. E., Bartol, F. F. et Hayashi, K. (2013). Uterine glands: development, function and experimental model systems. *Molecular Human Reproduction*, 19(9), 547-558. doi: 10.1093/molehr/gat031
- Crawford, G. et Ledger, W. (2019). In vitro fertilisation/intracytoplasmic sperm injection beyond 2020. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 126(2), 237-243.
- Crawford, J. L. et McNatty, K. P. (2012). The ratio of growth differentiation factor 9: Bone morphogenetic protein 15 mRNA expression is tightly co-regulated and differs between species over a wide range of ovulation rates. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 348(1), 339-343. doi: 10.1016/j.mce.2011.09.033
- Dai, L. N., Yan, J. K., Xiao, Y. T., Wen, J., Zhang, T., Zhou, K. J., . . . Cai, W. (2018). Butyrate stimulates the growth of human intestinal smooth muscle cells by activation of yes-associated protein. *Journal of Cellular Physiology*, 233(4), 3119-3128. doi: 10.1002/jcp.26149
- Davis, B. J., Lennard, D. E., Lee, C. A., Tiano, H. F., Morham, S. G., Wetsel, W. C. et Langenbach, R. (1999). Anovulation in Cyclooxygenase-2-Deficient Mice Is Restored by Prostaglandin E2 and Interleukin-1 $\beta$ \*. *Endocrinology*, 140(6), 2685-2695. doi: 10.1210/endo.140.6.6715
- Deb, K., Reese, J. et Paria, B. C. (2006). Methodologies to study implantation in mice. *Methods in Molecular Medicine*, 121, 9-34.
- Degasperi, A., Birtwistle, M. R., Volinsky, N., Rauch, J., Kolch, W. et Kholodenko, B. N. (2014). Evaluating strategies to normalise biological replicates of Western blot data. *PloS One*, 9(1), e87293. doi: 10.1371/journal.pone.0087293
- Di Pasquale, E., Beck-Peccoz, P. et Persani, L. (2004). Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15



- (BMP15) gene. *American Journal of Human Genetics*, 75(1), 106-111. doi: 10.1086/422103
- Dierich, A., Sairam, M. R., Monaco, L., Fimia, G. M., Gansmuller, A., LeMeur, M. et Sassone-Corsi, P. (1998). Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), 13612-13617. doi: 10.1073/pnas.95.23.13612
- Dinchuk, J. E., Car, B. D., Focht, R. J., Johnston, J. J., Jaffee, B. D., Covington, M. B., . . . Czerniak, P. M. J. N. (1995). Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *378(6555)*, 406-409.
- Dixit, H., Rao, L. K., Padmalatha, V. V., Kanakavalli, M., Deenadayal, M., Gupta, N., . . . Singh, L. (2006). Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Human Genetics*, 119(4), 408-415. doi: 10.1007/s00439-006-0150-0
- Dixon, R. E., Hwang, S. J., Hennig, G. W., Ramsey, K. H., Schripsema, J. H., Sanders, K. M. et Ward, S. M. (2009). Chlamydia Infection Causes Loss of Pacemaker Cells and Inhibits Oocyte Transport in the Mouse Oviduct1. *Biology of Reproduction*, 80(4), 665-673. doi: 10.1095/biolreprod.108.073833
- Dobrokhotov, O., Samsonov, M., Sokabe, M. et Hirata, H. (2018). Mechanoregulation and pathology of YAP/TAZ via Hippo and non-Hippo mechanisms. *Clin Transl Med*, 7(1), 23. doi: 10.1186/s40169-018-0202-9
- Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N. et Matzuk, M. M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383(6600), 531-535. doi: 10.1038/383531a0
- Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S. A., . . . Pan, D. (2007). Elucidation of a Universal Size-Control Mechanism in Drosophila and Mammals. *Cell*, 130(6), 1120-1133. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.019
- Dos Santos, E. C., Lalonde-Larue, A., Antoniazzi, A. Q., Barreta, M. H., Price, C. A., Dias Gonçalves, P. B., . . . Zamberlam, G. (2021). YAP signaling in preovulatory granulosa cells

- is critical for the functioning of the EGF network during ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 111524. doi: 10.1016/j.mce.2021.111524
- Dos Santos, E. C., St-Jean, G., Boyer, A., Price, C. A. et Zamberlam, G. (2021). *Are Hippo pathway effectors potential key players of dairy cattle cystic ovarian disease pathogenesis?* Communication présentée 14<sup>ième</sup> symposium du Réseau Québécois en Reproduction (RQR).
- Driskill, J. H. et Pan, D. (2021). The Hippo Pathway in Liver Homeostasis and Pathophysiology. *Annual Review of Pathology*, 16, 299-322. doi: 10.1146/annurev-pathol-030420-105050
- Dube, J. L., Wang, P., Elvin, J., Lyons, K. M., Celeste, A. J. et Matzuk, M. M. (1998). The Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Is X-Linked and Expressed in Oocytes. *Molecular Endocrinology*, 12(12), 1809-1817. doi: 10.1210/mend.12.12.0206
- Duffy, D. M., Ko, C., Jo, M., Brannstrom, M. et Curry, T. E., Jr. (2018). Ovulation: Parallels With Inflammatory Processes. *Endocrine Reviews*, 40(2), 369-416. doi: 10.1210/er.2018-00075
- Dunning, K. R., Watson, L. N., Zhang, V. J., Brown, H. M., Kaczmarek, A. K., Robker, R. L. et Russell, D. L. (2015). Activation of Mouse Cumulus-Oocyte Complex Maturation In Vitro Through EGF-Like Activity of Versican1. *Biology of Reproduction*, 92(5). doi: 10.1095/biolreprod.114.127274
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., . . . Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474(7350), 179-183. doi: 10.1038/nature10137
- Durlinger, A. L., Grujters, M. J., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H. A., Nachtigal, M. W., . . . Themmen, A. P. (2002). Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, 143(3), 1076-1084. doi: 10.1210/endo.143.3.8691
- Durlinger, A. L., Grujters, M. J., Kramer, P., Karels, B., Kumar, T. R., Matzuk, M. M., . . . Themmen, A. P. (2001). Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*, 142(11), 4891-4899. doi: 10.1210/endo.142.11.8486

- Durlinger, A. L., Kramer, P., Karels, B., de Jong, F. H., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A. et Themmen, A. P. (1999). Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*, *140*(12), 5789-5796. doi: 10.1210/endo.140.12.7204
- Edson, M. A., Nagaraja, A. K. et Matzuk, M. M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*, *30*(6), 624-712. doi: 10.1210/er.2009-0012
- Elbediwy, A., Vincent-Mistiaen, Z. I., Spencer-Dene, B., Stone, R. K., Boeing, S., Wculek, S. K., . . . Thompson, B. J. (2016). Integrin signalling regulates YAP and TAZ to control skin homeostasis. *Development*, *143*(10), 1674-1687. doi: 10.1242/dev.133728
- Elvin, J. A., Yan, C., Wang, P., Nishimori, K. et Matzuk, M. M. (1999). Molecular Characterization of the Follicle Defects in the Growth Differentiation Factor 9-Deficient Ovary. *Molecular Endocrinology*, *13*(6), 1018-1034. doi: 10.1210/mend.13.6.0309
- Ewen, K. A. et Koopman, P. (2010). Mouse germ cell development: from specification to sex determination. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *323*(1), 76-93. doi: 10.1016/j.mce.2009.12.013
- Ezzati, M. M., Baker, M. D., Saatcioglu, H. D., Aloisio, G. M., Pena, C. G., Nakada, Y., . . . Castrillon, D. H. (2015). Regulation of FOXO3 subcellular localization by Kit ligand in the neonatal mouse ovary. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *32*(12), 1741-1747. doi: 10.1007/s10815-015-0589-9
- Fan, H. Y., Liu, Z., Cahill, N. et Richards, J. S. (2008). Targeted disruption of Pten in ovarian granulosa cells enhances ovulation and extends the life span of luteal cells. *Molecular Endocrinology*, *22*(9), 2128-2140. doi: 10.1210/me.2008-0095
- Fan, H. Y., Liu, Z., Johnson, P. F. et Richards, J. S. (2011). CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP)- $\alpha$  and - $\beta$  are essential for ovulation, luteinization, and the expression of key target genes. *Molecular Endocrinology*, *25*(2), 253-268. doi: 10.1210/me.2010-0318
- Fan, H. Y., Liu, Z., Shimada, M., Sterneck, E., Johnson, P. F., Hedrick, S. M. et Richards, J. S. (2009). MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science*, *324*(5929), 938-941. doi: 10.1126/science.1171396

- Farookhi, R. et Desjardins, J. (1986). Luteinizing hormone receptor induction in dispersed granulosa cells requires estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 47(1), 13-24. doi: 10.1016/0303-7207(86)90011-0
- Farquhar, C. M. (2005). Ectopic pregnancy. *The Lancet*, 366(9485), 583-591. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67103-6
- Ferguson, L., Kaftanovskaya, E. M., Manresa, C., Barbara, A. M., Poppiti, R. J., Tan, Y. et Agoulnik, A. I. (2016). Constitutive Notch Signaling Causes Abnormal Development of the Oviducts, Abnormal Angiogenesis, and Cyst Formation in Mouse Female Reproductive Tract. *Biology of Reproduction*, 94(3), 67. doi: 10.1095/biolreprod.115.134569
- Ferrara, N., Chen, H., Davis-Smyth, T., Gerber, H.-P., Nguyen, T.-N., Peers, D., . . . Schwall, R. H. (1998). Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nature Medicine*, 4(3), 336-340. doi: 10.1038/nm0398-336
- Ferris, H. A. et Shupnik, M. A. (2006). Mechanisms for Pulsatile Regulation of the Gonadotropin Subunit Genes by GNRH11. *Biology of Reproduction*, 74(6), 993-998. doi: 10.1095/biolreprod.105.049049
- Fu, D., Lv, X., Hua, G., He, C., Dong, J., Lele, S. M., . . . Wang, C. (2014). YAP regulates cell proliferation, migration, and steroidogenesis in adult granulosa cell tumors. *Endocrine-Related Cancer*, 21(2), 297-310. doi: 10.1530/erc-13-0339
- Fu, J., Zheng, M., Zhang, X., Zhang, Y., Chen, Y., Li, H., . . . Zhang, J. (2017). Fibulin-5 promotes airway smooth muscle cell proliferation and migration via modulating Hippo-YAP/TAZ pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 493(2), 985-991. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.105
- Fu, V., Plouffe, S. W. et Guan, K. L. (2017). The Hippo pathway in organ development, homeostasis, and regeneration. *Current Opinion in Cell Biology*, 49, 99-107. doi: 10.1016/j.ceb.2017.12.012
- Fujibe, Y., Baba, T., Nagao, S., Adachi, S., Ikeda, K., Morishita, M., . . . Saito, T. (2019). Androgen potentiates the expression of FSH receptor and supports preantral follicle development in mice. *J Ovarian Res*, 12(1), 31. doi: 10.1186/s13048-019-0505-5

- Furth, N., Aylon, Y. et Oren, M. (2018). p53 shades of Hippo. *Cell Death and Differentiation*, 25(1), 81-92. doi: 10.1038/cdd.2017.163
- Galloway, S. M., McNatty, K. P., Cambridge, L. M., Laitinen, M. P., Juengel, J. L., Jokiranta, T. S., . . . Ritvos, O. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*, 25(3), 279-283. doi: 10.1038/77033
- Gao, Y., Bayless, K. J. et Li, Q. (2014). TGFBR1 Is Required for Mouse Myometrial Development. *Molecular Endocrinology*, 28(3), 380-394. doi: 10.1210/me.2013-1284
- Gibori, G. et Richards, J. S. (1978). Dissociation of Two Distinct Luteotropic Effects of Prolactin: Regulation of Luteinizing Hormone-Receptor Content and Progesterone Secretion during Pregnancy\*. *Endocrinology*, 102(3), 767-774. doi: 10.1210/endo-102-3-767
- Gilula, N. B., Epstein, M. L. et Beers, W. H. J. J. o. C. B. (1978). Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. 78(1), 58-75.
- Ginsburg, M., Snow, M. H. et McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, 110(2), 521-528. doi: 10.1242/dev.110.2.521
- Glantschnig, H., Rodan, G. A. et Reszka, A. A. (2002). Mapping of MST1 Kinase Sites of Phosphorylation: Activation and Autophosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), 42987-42996. doi: 10.1074/jbc.M208538200
- Gobé, C. et Mandon-Pépin, B. J. M. d. I. R. (2019). Des souris et des femmes: une ovogenèse foétale similaire? , 21(2), 111-126.
- Godin, P., Tsoi, M., Morin, M., Gévry, N. et Boerboom, D. (2022). Additional File 1 (Publication no. 10.6084/m9.figshare.19016150.v1). Repéré à [https://figshare.com/articles/dataset/Additional\\_File\\_1/19016150](https://figshare.com/articles/dataset/Additional_File_1/19016150)
- Godin, P., Tsoi, M., Paquet, M. et Boerboom, D. (2020). YAP and TAZ are required for the postnatal development and the maintenance of the structural integrity of the oviduct. *Reproduction*, 160(2), 307-318. doi: 10.1530/rep-20-0202
- Gonzalez, G. et Behringer, R. R. (2009). Dicer is required for female reproductive tract development and fertility in the mouse. *Molecular Reproduction and Development*, 76(7), 678-688. doi: 10.1002/mrd.21010

- Grannas, K., Arngården, L., Lönn, P., Mazurkiewicz, M., Blokzijl, A., Zieba, A. et Söderberg, O. (2015). Crosstalk between Hippo and TGF $\beta$ : Subcellular Localization of YAP/TAZ/Smad Complexes. *Journal of Molecular Biology*, 427(21), 3407-3415. doi: 10.1016/j.jmb.2015.04.015
- Gray, C. A., Bartol, F. F., Tarleton, B. J., Wiley, A. A., Johnson, G. A., Bazer, F. W. et Spencer, T. E. (2001). Developmental Biology of Uterine Glands1. *Biology of Reproduction*, 65(5), 1311-1323. doi: 10.1095/biolreprod65.5.1311
- Gregory, S. J. et Kaiser, U. B. (2004). *Regulation of gonadotropins by inhibin and activin*. Communication présentée Seminars in Reproductive Medicine.
- Grijalva, J. L., Huizenga, M., Mueller, K., Rodriguez, S., Brazzo, J., Camargo, F., . . . Physiology, L. (2014). Dynamic alterations in Hippo signaling pathway and YAP activation during liver regeneration. 307(2), G196-G204.
- Grosdemouge, I., Bachelot, A., Lucas, A., Baran, N., Kelly, P. A. et Binart, N. (2003). Effects of deletion of the prolactin receptor on ovarian gene expression. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1), 12. doi: 10.1186/1477-7827-1-12
- Gu, Y., Runyan, C., Shoemaker, A., Surani, A. et Wylie, C. (2009). Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. *Development*, 136(8), 1295-1303. doi: 10.1242/dev.030619
- Guioli, S., Sekido, R. et Lovell-Badge, R. (2007). The origin of the Mullerian duct in chick and mouse. *Developmental Biology*, 302(2), 389-398. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.09.046
- Hakimi, O. et Cameron, L. C. (2017). Effect of Exercise on Ovulation: A Systematic Review. *Sports Medicine*, 47(8), 1555-1567. doi: 10.1007/s40279-016-0669-8
- Halbert, S. A., Becker, D. R. et Szal, S. (1989). Ovum transport in the rat oviductal ampulla in the absence of muscle contractility. *Biology of Reproduction*, 40(6), 1131-1136.
- Hall, C. A., Wang, R., Miao, J., Oliva, E., Shen, X., Wheeler, T., . . . Goode, S. (2010). Hippo pathway effector Yap is an ovarian cancer oncogene. *Cancer Research*, 70(21), 8517-8525. doi: 10.1158/0008-5472.Can-10-1242

- Hamaratoglu, F., Willecke, M., Kango-Singh, M., Nolo, R., Hyun, E., Tao, C., . . . Halder, G. (2006). The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nature Cell Biology*, *8*(1), 27-36. doi: 10.1038/ncb1339
- Hamilton-Fairley, D. et Taylor, A. (2003). Anovulation. *BMJ*, *327*(7414), 546-549. doi: 10.1136/bmj.327.7414.546
- Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R. et Galloway, S. M. (2004). Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*)<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, *70*(4), 900-909. doi: 10.1095/biolreprod.103.023093
- Hansen, C. G., Moroishi, T. et Guan, K.-L. (2015). YAP and TAZ: a nexus for Hippo signaling and beyond. *Trends in Cell Biology*, *25*(9), 499-513. doi: 10.1016/j.tcb.2015.05.002
- Hao, Y., Chun, A., Cheung, K., Rashidi, B. et Yang, X. J. J. o. B. C. (2008). Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. *283*(9), 5496-5509.
- Hayashi, K., Yoshioka, S., Reardon, S. N., Rucker, E. B., 3rd, Spencer, T. E., DeMayo, F. J., . . . MacLean, J. A., 2nd. (2011). WNTs in the neonatal mouse uterus: potential regulation of endometrial gland development. *Biology of Reproduction*, *84*(2), 308-319. doi: 10.1095/biolreprod.110.088161
- He, C., Lv, X., Hua, G., Lele, S. M., Remmenga, S., Dong, J., . . . Wang, C. (2015). YAP forms autocrine loops with the ERBB pathway to regulate ovarian cancer initiation and progression. *Oncogene*, *34*(50), 6040-6054. doi: 10.1038/onc.2015.52
- Herbison, A. E. (2014). Chapter 11 - Physiology of the Adult Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network (*Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*: Elsevier Science.
- Hergovich, A., Schmitz, D. et Hemmings, B. A. (2006). The human tumour suppressor LATS1 is activated by human MOB1 at the membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *345*(1), 50-58. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.03.244
- Hilliard, J. J. B. o. R. (1973). Corpus luteum function in guinea pigs, hamsters, rats, mice and rabbits. *8*(2), 203-221.

- Holden, J. K. et Cunningham, C. N. (2018). Targeting the Hippo Pathway and Cancer through the TEAD Family of Transcription Factors. *Cancers*, *10*(3). doi: 10.3390/cancers10030081
- Hong, A. W., Meng, Z., Yuan, H. X., Plouffe, S. W., Moon, S., Kim, W., . . . Guan, K. L. (2017). Osmotic stress-induced phosphorylation by NLK at Ser128 activates YAP. *EMBO Reports*, *18*(1), 72-86. doi: 10.15252/embr.201642681
- Hong, J. H., Hwang, E. S., McManus, M. T., Amsterdam, A., Tian, Y., Kalmukova, R., . . . Yaffe, M. B. (2005). TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science*, *309*(5737), 1074-1078. doi: 10.1126/science.1110955
- Hong, W. et Guan, K. L. (2012). The YAP and TAZ transcription co-activators: key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *23*(7), 785-793. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.05.004
- Hong, X., Luense, L. J., McGinnis, L. K., Nothnick, W. B. et Christenson, L. K. (2008). Dicer1 is essential for female fertility and normal development of the female reproductive system. *Endocrinology*, *149*(12), 6207-6212. doi: 10.1210/en.2008-0294
- Hosaka, T., Biggs, W. H., 3rd, Tieu, D., Boyer, A. D., Varki, N. M., Cavenee, W. K. et Arden, K. C. (2004). Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(9), 2975-2980. doi: 10.1073/pnas.0400093101
- Hossain, Z., Ali, S. M., Ko, H. L., Xu, J., Ng, C. P., Guo, K., . . . Hunziker, W. (2007). Glomerulocystic kidney disease in mice with a targeted inactivation of Wwtr1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(5), 1631-1636. doi: 10.1073/pnas.0605266104
- Hsieh, M. et Conti, M. (2005). G-protein-coupled receptor signaling and the EGF network in endocrine systems. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *16*(7), 320-326. doi: 10.1016/j.tem.2005.07.005
- Hsieh, M., Lee, D., Panigone, S., Horner, K., Chen, R., Theologis, A., . . . Conti, M. (2007). Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(5), 1914-1924. doi: 10.1128/mcb.01919-06



- Hsueh, A. J., Billig, H. et Tsafri, A. (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews*, 15(6), 707-724. doi: 10.1210/edrv-15-6-707
- Hsueh, A. J., Kawamura, K., Cheng, Y. et Fauser, B. C. (2015). Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine Reviews*, 36(1), 1-24. doi: 10.1210/er.2014-1020
- Hu, J., Gray, C. A. et Spencer, T. E. (2004). Gene Expression Profiling of Neonatal Mouse Uterine Development1. *Biology of Reproduction*, 70(6), 1870-1876. doi: 10.1095/biolreprod.103.026336
- Hu, L. L., Su, T., Luo, R. C., Zheng, Y. H., Huang, J., Zhong, Z. S., . . . Zheng, L. P. (2019). Hippo pathway functions as a downstream effector of AKT signaling to regulate the activation of primordial follicles in mice. *Journal of Cellular Physiology*, 234(2), 1578-1587. doi: 10.1002/jcp.27024
- Hu, R., Wang, F. M., Yu, L., Luo, Y., Wu, X., Li, J., . . . Bocca, S. (2014). Antimüllerian hormone regulates stem cell factor expression in human granulosa cells. *Fertility and Sterility*, 102(6), 1742-1750.e1741. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.08.012
- Hua, G., Lv, X., He, C., Remmenga, S. W., Rodabough, K. J., Dong, J., . . . Wang, C. (2016). YAP induces high-grade serous carcinoma in fallopian tube secretory epithelial cells. *Oncogene*, 35(17), 2247-2265. doi: 10.1038/onc.2015.288
- Huang da, W., Sherman, B. T. et Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), 44-57. doi: 10.1038/nprot.2008.211
- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K. et Pan, D. (2005). The Hippo Signaling Pathway Coordinately Regulates Cell Proliferation and Apoptosis by Inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. *Cell*, 122(3), 421-434. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.007
- Hunzicker-Dunn, M. et Mayo, K. (2014). Chapter 20 - Gonadotropin Signaling in the Ovary (*Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*: Elsevier Science).
- Hwang, A.-R., Nam, J.-O. et Kang, Y. J. (2018). Fluvastatin inhibits advanced glycation end products-induced proliferation, migration, and extracellular matrix accumulation in vascular smooth muscle cells by targeting connective tissue growth factor. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological*

- Society and the Korean Society of Pharmacology*, 22(2), 193-201. doi: 10.4196/kjpp.2018.22.2.193
- Jacob, M., Konrad, K. et Jacob, H. J. C. T. O. (1999). Early development of the Müllerian duct in avian embryos with reference to the human. *164*(2), 63-81.
- Jamin, S. P., Arango, N. A., Mishina, Y., Hanks, M. C. et Behringer, R. R. (2002). Requirement of *Bmpr1a* for Müllerian duct regression during male sexual development. *Nature Genetics*, 32(3), 408-410. doi: 10.1038/ng1003
- Ji, S. Y., Liu, X. M., Li, B. T., Zhang, Y. L., Liu, H. B., Zhang, Y. C., . . . Fan, H. Y. (2017). The polycystic ovary syndrome-associated gene *Yap1* is regulated by gonadotropins and sex steroid hormones in hyperandrogenism-induced oligo-ovulation in mouse. *Molecular Human Reproduction*, 23(10), 698-707. doi: 10.1093/molehr/gax046
- Jiang, J. Y., Cheung, C. K., Wang, Y. et Tsang, B. K. (2003). Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Frontiers in Bioscience*, 8, d222-237. doi: 10.2741/949
- Jiao, S., Wang, H., Shi, Z., Dong, A., Zhang, W., Song, X., . . . Wang, W. J. C. c. (2014). A peptide mimicking *VGLL4* function acts as a *YAP* antagonist therapy against gastric cancer. *25*(2), 166-180.
- Jin, X., Han, C. S., Yu, F. Q., Wei, P., Hu, Z. Y. et Liu, Y. X. (2005). Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction. *Molecular Reproduction and Development*, 70(1), 82-90. doi: 10.1002/mrd.20142
- John, G. B., Gallardo, T. D., Shirley, L. J. et Castrillon, D. H. (2008). *Foxo3* is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Developmental Biology*, 321(1), 197-204. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.06.017
- Johnson, A. L. (2003). Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Animal Reproduction Science*, 78(3), 185-201. doi: 10.1016/S0378-4320(03)00090-3
- Jorgez, C. J., Klysiak, M., Jamin, S. P., Behringer, R. R. et Matzuk, M. M. (2004). Granulosa Cell-Specific Inactivation of *Follistatin* Causes Female Fertility Defects. *Molecular Endocrinology*, 18(4), 953-967. doi: 10.1210/me.2003-0301

- Juengel, J. L., Hudson, N. L., Berg, M., Hamel, K., Smith, P., Lawrence, S. B., . . . McNatty, K. P. (2009). Effects of active immunization against growth differentiation factor 9 and/or bone morphogenetic protein 15 on ovarian function in cattle. *Reproduction*, *138*(1), 107-114. doi: 10.1530/rep-09-0009
- Justice, R. W., Zilian, O., Woods, D. F., Noll, M. et Bryant, P. J. (1995). The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes & Development*, *9*(5), 534-546.
- Kanai, F., Marignani, P. A., Sarbassova, D., Yagi, R., Hall, R. A., Donowitz, M., . . . Cantley, L. C. J. T. E. j. (2000). TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *19*(24), 6778-6791.
- Kashimada, K., Svingen, T., Feng, C. W., Pelosi, E., Bagheri-Fam, S., Harley, V. R., . . . Koopman, P. (2011). Antagonistic regulation of Cyp26b1 by transcription factors SOX9/SF1 and FOXL2 during gonadal development in mice. *FASEB Journal*, *25*(10), 3561-3569. doi: 10.1096/fj.11-184333
- Kawamura, K., Cheng, Y., Kawamura, N., Takae, S., Okada, A., Kawagoe, Y., . . . Hsueh, A. J. W. (2011). Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. *Human Reproduction*, *26*(11), 3094-3101. doi: 10.1093/humrep/der282
- Kawamura, K., Cheng, Y., Suzuki, N., Deguchi, M., Sato, Y., Takae, S., . . . Hsueh, A. J. (2013). Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(43), 17474-17479. doi: 10.1073/pnas.1312830110
- Kawashima, I. et Kawamura, K. (2018). Regulation of follicle growth through hormonal factors and mechanical cues mediated by Hippo signaling pathway. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *64*(1), 3-11. doi: 10.1080/19396368.2017.1411990
- Kerr, J. B., Myers, M. et Anderson, R. A. (2013). The dynamics of the primordial follicle reserve. *Reproduction*, *146*(6), R205-215. doi: 10.1530/rep-13-0181

- Kezele, P., Nilsson, E. E. et Skinner, M. K. (2005). Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biology of Reproduction*, 73(5), 967-973. doi: 10.1095/biolreprod.105.043117
- Kim, H., Kim, M., Im, S.-K. et Fang, S. J. L. a. r. (2018). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. 34(4), 147-159.
- Kim, K. M., Oh, H. T., Yoo, G. D., Hwang, J. H., Oh, A., Hwang, E. S. et Hong, J. H. (2020). Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif stimulates epidermal regeneration via induction of amphiregulin expression after ultraviolet damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 524(1), 242-248. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.079
- Kim, M., Kim, M., Lee, S., Kuninaka, S., Saya, H., Lee, H., . . . Lim, D. S. (2013). cAMP/PKA signalling reinforces the LATS-YAP pathway to fully suppress YAP in response to actin cytoskeletal changes. *EMBO Journal*, 32(11), 1543-1555. doi: 10.1038/emboj.2013.102
- Kim, N. G., Koh, E., Chen, X. et Gumbiner, B. M. (2011). E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(29), 11930-11935. doi: 10.1073/pnas.1103345108
- Kim, W., Khan, S. K., Gvozdenovic-Jeremic, J., Kim, Y., Dahlman, J., Kim, H., . . . Yang, Y. (2017). Hippo signaling interactions with Wnt/beta-catenin and Notch signaling repress liver tumorigenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 127(1), 137-152. doi: 10.1172/jci88486
- Kimura, T. E., Duggirala, A., Smith, M. C., White, S., Sala-Newby, G. B., Newby, A. C. et Bond, M. (2016). The Hippo pathway mediates inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by cAMP. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 90, 1-10. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.11.024
- Kobayashi, A., Shawlot, W., Kania, A. et Behringer, R. R. (2004). Requirement of Lim1 for female reproductive tract development. *Development*, 131(3), 539-549. doi: 10.1242/dev.00951
- Kodaka, M. et Hata, Y. (2015). The mammalian Hippo pathway: regulation and function of YAP1 and TAZ. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(2), 285-306. doi: 10.1007/s00018-014-1742-9

- Koopman, P. et Gubbay, J. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, 351(6322), 117.
- Kumar, T. R., Wang, Y., Lu, N. et Matzuk, M. M. (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature Genetics*, 15(2), 201-204. doi: 10.1038/ng0297-201
- Kwon, H., Kim, J. et Jho, E. H. (2021). Role of the Hippo pathway and mechanisms for controlling cellular localization of YAP/TAZ. *FEBS Journal*. doi: 10.1111/febs.16091
- Laguë, M. N., Paquet, M., Fan, H. Y., Kaartinen, M. J., Chu, S., Jamin, S. P., . . . Boerboom, D. (2008). Synergistic effects of Pten loss and WNT/CTNNB1 signaling pathway activation in ovarian granulosa cell tumor development and progression. *Carcinogenesis*, 29(11), 2062-2072. doi: 10.1093/carcin/bgn186
- Lai, Z. C., Wei, X., Shimizu, T., Ramos, E., Rohrbaugh, M., Nikolaidis, N., . . . Li, Y. (2005). Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. *Cell*, 120(5), 675-685. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.036
- Lapointe, E., Boyer, A., Rico, C., Paquet, M., Franco, H. L., Gossen, J., . . . Boerboom, D. (2012). FZD1 regulates cumulus expansion genes and is required for normal female fertility in mice. *Biology of Reproduction*, 87(5), 104. doi: 10.1095/biolreprod.112.102608
- Lau, L. F. et Lam, S. C. T. (1999). The CCN Family of Angiogenic Regulators: The Integrin Connection. *Experimental Cell Research*, 248(1), 44-57. doi: 10.1006/excr.1999.4456
- Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A., Zeinstra, L. M., Davis, A. M., Wright, C. V., . . . development. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *13(4)*, 424-436.
- Lee, H.-Y., Chung, J.-W., Youn, S.-W., Kim, J.-Y., Park, K.-W., Koo, B.-K., . . . Kim, H.-S. (2007). Forkhead transcription factor FOXO3a is a negative regulator of angiogenic immediate early gene CYR61, leading to inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circulation Research*, 100(3), 372-380. doi: 10.1161/01.RES.0000257945.97958.77

- Lee, Y., Kim, N. H., Cho, E. S., Yang, J. H., Cha, Y. H., Kang, H. E., . . . Yook, J. I. (2018). Dishevelled has a YAP nuclear export function in a tumor suppressor context-dependent manner. *Nat Commun*, *9*(1), 2301. doi: 10.1038/s41467-018-04757-w
- Lei, L. et Spradling, A. C. (2013). Mouse primordial germ cells produce cysts that partially fragment prior to meiosis. *Development*, *140*(10), 2075-2081. doi: 10.1242/dev.093864
- Lei, Q. Y., Zhang, H., Zhao, B., Zha, Z. Y., Bai, F., Pei, X. H., . . . Guan, K. L. (2008). TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(7), 2426-2436. doi: 10.1128/mcb.01874-07
- Li, Q., Agno, J. E., Edson, M. A., Nagaraja, A. K., Nagashima, T. et Matzuk, M. M. (2011). Transforming growth factor beta receptor type 1 is essential for female reproductive tract integrity and function. *PLoS Genetics*, *7*(10), e1002320. doi: 10.1371/journal.pgen.1002320
- Li, T., Zhao, H., Zhao, X., Zhang, B., Cui, L., Shi, Y., . . . Chen, Z. J. (2012). Identification of YAP1 as a novel susceptibility gene for polycystic ovary syndrome. *Journal of Medical Genetics*, *49*(4), 254-257. doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100727
- Li, X., Li, K., Chen, Y. et Fang, F. (2021). The Role of Hippo Signaling Pathway in the Development of the Nervous System. *Developmental Neuroscience*, *43*(5), 263-270. doi: 10.1159/000515633
- Li, Y., Hibbs, M. A., Gard, A. L., Shylo, N. A. et Yun, K. (2012). Genome-wide analysis of N1ICD/RBPJ targets in vivo reveals direct transcriptional regulation of Wnt, SHH, and hippo pathway effectors by Notch1. *Stem Cells*, *30*(4), 741-752. doi: 10.1002/stem.1030
- Li, Y., Zhou, H., Li, F., Chan, S. W., Lin, Z., Wei, Z., . . . Zhang, M. (2015). Angiotensin binding-induced activation of Merlin/NF2 in the Hippo pathway. *Cell Research*, *25*(7), 801-817. doi: 10.1038/cr.2015.69
- Lim, H., Paria, B. C., Das, S. K., Dinchuk, J. E., Langenbach, R., Trzaskos, J. M. et Dey, S. K. (1997). Multiple Female Reproductive Failures in Cyclooxygenase 2-Deficient Mice. *Cell*, *91*(2), 197-208. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80402-X
- Lin, K. C., Park, H. W. et Guan, K. L. (2017). Regulation of the Hippo Pathway Transcription Factor TEAD. *Trends in Biochemical Sciences*, *42*(11), 862-872. doi: 10.1016/j.tibs.2017.09.003

- Liu-Chittenden, Y., Huang, B., Shim, J. S., Chen, Q., Lee, S. J., Anders, R. A., . . . Pan, D. (2012). Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes & Development*, *26*(12), 1300-1305. doi: 10.1101/gad.192856.112
- Liu, C.-Y., Zha, Z.-Y., Zhou, X., Zhang, H., Huang, W., Zhao, D., . . . Hong, W. J. J. o. B. C. (2010). The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF $\beta$ -TrCP E3 ligase. *285*(48), 37159-37169.
- Liu, C., Peng, J., Matzuk, M. M. et Yao, H. H. C. (2015). Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells. *Nature Communications*, *6*(1), 6934. doi: 10.1038/ncomms7934
- Liu, L., Zhai, C., Pan, Y., Zhu, Y., Shi, W., Wang, J., . . . Li, M. (2018). Sphingosine-1-phosphate induces airway smooth muscle cell proliferation, migration, and contraction by modulating Hippo signaling effector YAP. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, *315*(4), L609-L621. doi: 10.1152/ajplung.00554.2017
- Liu, Z., Fan, H.-Y., Wang, Y. et Richards, J. S. (2010). Targeted Disruption of Mapk14 (p38MAPK $\alpha$ ) in Granulosa Cells and Cumulus Cells Causes Cell-Specific Changes in Gene Expression Profiles that Rescue COC Expansion and Maintain Fertility. *Molecular Endocrinology*, *24*(9), 1794-1804. doi: 10.1210/me.2010-0086
- Long, M. A. et Rossi, F. M. (2009). Silencing inhibits Cre-mediated recombination of the Z/AP and Z/EG reporters in adult cells. *PloS One*, *4*(5), e5435. doi: 10.1371/journal.pone.0005435
- Lovell-Badge, R. et Robertson, E. (1990). XY female mice resulting from a heritable mutation in the primary testis-determining gene, Tdy. *Development*, *109*(3), 635-646.
- Lu, E., Li, C., Wang, J. et Zhang, C. (2019). Inflammation and angiogenesis in the corpus luteum. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, *45*(10), 1967-1974. doi: 10.1111/jog.14076
- Lu, L., Li, Y., Kim, S. M., Bossuyt, W., Liu, P., Qiu, Q., . . . Lee, J.-S. J. P. o. t. N. A. o. S. (2010). Hippo signaling is a potent in vivo growth and tumor suppressor pathway in the mammalian liver. *107*(4), 1437-1442.

- Lunenfeld, B. (2004). Historical perspectives in gonadotrophin therapy. *Human Reproduction Update*, 10(6), 453-467. doi: 10.1093/humupd/dmh044
- Luo, J. et Yu, F. X. (2019). GPCR-Hippo Signaling in Cancer. *Cells*, 8(5). doi: 10.3390/cells8050426
- Lv, X., He, C., Huang, C., Wang, H., Hua, G., Wang, Z., . . . Wang, C. (2019). Timely expression and activation of YAP1 in granulosa cells is essential for ovarian follicle development. *FASEB Journal*, 33(9), 10049-10064. doi: 10.1096/fj.201900179RR
- Lydon, J. P., DeMayo, F. J., Funk, C. R., Mani, S. K., Hughes, A. R., Montgomery, C. A., Jr., . . . O'Malley, B. W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & Development*, 9(18), 2266-2278. doi: 10.1101/gad.9.18.2266
- Ma, S., Meng, Z., Chen, R. et Guan, K. L. (2019). The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. *Annual Review of Biochemistry*, 88, 577-604. doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-111829
- Maatouk, D. M., DiNapoli, L., Alvers, A., Parker, K. L., Taketo, M. M. et Capel, B. (2008). Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Human Molecular Genetics*, 17(19), 2949-2955. doi: 10.1093/hmg/ddn193
- Magnusson, C. et Hillensjö, T. J. J. o. E. Z. (1977). Inhibition of maturation and metabolism in rat oocytes by cyclic AMP. *201*(1), 139-147.
- Magoffin, D. A. (2005). Ovarian theca cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(7), 1344-1349. doi: 10.1016/j.biocel.2005.01.016
- Manderfield, L. J., Aghajanian, H., Engleka, K. A., Lim, L. Y., Liu, F., Jain, R., . . . Epstein, J. A. (2015). Hippo signaling is required for Notch-dependent smooth muscle differentiation of neural crest. *Development*, 142(17), 2962-2971. doi: 10.1242/dev.125807
- Mannaerts, I., Leite, S. B., Verhulst, S., Claerhout, S., Eysackers, N., Thoen, L. F. R., . . . van Grunsven, L. A. (2015). The Hippo pathway effector YAP controls mouse hepatic stellate cell activation. *Journal of Hepatology*, 63(3), 679-688. doi: 10.1016/j.jhep.2015.04.011
- McConnell, N. A., Yunus, R. S., Gross, S. A., Bost, K. L., Clemens, M. G. et Hughes, F. M., Jr. (2002). Water Permeability of an Ovarian Antral Follicle Is Predominantly Transcellular



- and Mediated by Aquaporins. *Endocrinology*, 143(8), 2905-2912. doi: 10.1210/endo.143.8.8953
- McGrath, S. A., Esquela, A. F. et Lee, S. J. (1995). Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Molecular Endocrinology*, 9(1), 131-136. doi: 10.1210/mend.9.1.7760846
- McLaren, A. (2003). Primordial germ cells in the mouse. *Developmental Biology*, 262(1), 1-15. doi: 10.1016/S0012-1606(03)00214-8
- McWilliams, M. M. et Chennathukuzhi, V. M. (2017). Recent Advances in Uterine Fibroid Etiology. *Seminars in Reproductive Medicine*, 35(2), 181-189. doi: 10.1055/s-0037-1599090
- Meng, Z., Moroishi, T. et Guan, K. L. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & Development*, 30(1), 1-17. doi: 10.1101/gad.274027.115
- Meng, Z., Moroishi, T., Mottier-Pavie, V., Plouffe, S. W., Hansen, C. G., Hong, A. W., . . . Guan, K. L. (2015). MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. *Nat Commun*, 6, 8357. doi: 10.1038/ncomms9357
- Mesiano, S. et Jones, E. E. (2017). Chapter 53: Sexual differentiation (*Medical physiology - 3rd edition* (p. 1077).
- MGI. (2021). Genes and Markers Query Form. Repéré 2021 à <http://www.informatics.jax.org/marker>
- Mi, H., Muruganujan, A., Huang, X., Ebert, D., Mills, C., Guo, X. et Thomas, P. D. (2019). Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nature Protocols*, 14(3), 703-721. doi: 10.1038/s41596-019-0128-8
- Mi, W., Lin, Q., Childress, C., Sudol, M., Robishaw, J., Berlot, C. H., . . . Yang, W. (2015). Geranylgeranylation signals to the Hippo pathway for breast cancer cell proliferation and migration. *Oncogene*, 34(24), 3095-3106. doi: 10.1038/onc.2014.251
- Miller, B. H. et Takahashi, J. S. (2013). Central circadian control of female reproductive function. *Frontiers in Endocrinology*, 4, 195. doi: 10.3389/fendo.2013.00195

- Miller, C. et Sassoon, D. A. (1998). Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Development*, 125(16), 3201-3211.
- Miyamoto, N., Yoshida, M., Kuratani, S., Matsuo, I. et Aizawa, S. (1997). Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development*, 124(9), 1653-1664.
- Mohajan, S., Jaiswal, P. K., Vatanmakarian, M., Yousefi, H., Sankaralingam, S., Alahari, S. K., . . . Koul, H. K. (2021). Hippo pathway: Regulation, deregulation and potential therapeutic targets in cancer. *Cancer Letters*, 507, 112-123. doi: 10.1016/j.canlet.2021.03.006
- Molyneaux, K. A., Stallock, J., Schaible, K. et Wylie, C. (2001). Time-Lapse Analysis of Living Mouse Germ Cell Migration. *Developmental Biology*, 240(2), 488-498. doi: 10.1006/dbio.2001.0436
- Moon, S., Kim, W., Kim, S., Kim, Y., Song, Y., Bilousov, O., . . . Jho, E. H. (2017). Phosphorylation by NLK inhibits YAP-14-3-3-interactions and induces its nuclear localization. *EMBO Reports*, 18(1), 61-71. doi: 10.15252/embr.201642683
- Morciano, G., Vezzani, B., Missiroli, S., Boncompagni, C., Pinton, P. et Giorgi, C. (2021). An Updated Understanding of the Role of YAP in Driving Oncogenic Responses. *Cancers*, 13(12). doi: 10.3390/cancers13123100
- Mori, M., Triboulet, R., Mohseni, M., Schlegelmilch, K., Shrestha, K., Camargo, F. D. et Gregory, R. I. (2014). Hippo signaling regulates Microprocessor and links cell density-dependent miRNA biogenesis to cancer. *Cell*, 156(5), 893-906. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.043
- Morin-Kensicki, E. M., Boone, B. N., Howell, M., Stonebraker, J. R., Teed, J., Alb, J. G., . . . Milgram, S. L. (2006). Defects in yolk sac vasculogenesis, chorioallantoic fusion, and embryonic axis elongation in mice with targeted disruption of *Yap65*. *Molecular and Cellular Biology*, 26(1), 77-87. doi: 10.1128/mcb.26.1.77-87.2006
- Mukherjee, A., Park-Sarge, O. K. et Mayo, K. E. (1996). Gonadotropins induce rapid phosphorylation of the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, 137(8), 3234-3245. doi: 10.1210/endo.137.8.8754745

- Murakami, M., Nakagawa, M., Olson, E. N. et Nakagawa, O. (2005). A WW domain protein TAZ is a critical coactivator for TBX5, a transcription factor implicated in Holt-Oram syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(50), 18034-18039. doi: 10.1073/pnas.0509109102
- Murphy, B. D. (2004). CHAPTER 11 - Luteinization. Dans P. C. K. Leung & E. Y. Adashi (dir.), *The Ovary (Second Edition)* (p. 185-199). San Diego: Academic Press.
- Myers, M., Morgan, F. H., Liew, S. H., Zerafa, N., Gamage, T. U., Sarraj, M., . . . Hutt, K. J. (2014). PUMA regulates germ cell loss and primordial follicle endowment in mice. *Reproduction*, *148*(2), 211-219. doi: 10.1530/rep-13-0666
- Nagaraja, A. K., Andreu-Vieyra, C., Franco, H. L., Ma, L., Chen, R., Han, D. Y., . . . Matzuk, M. M. (2008). Deletion of Dicer in somatic cells of the female reproductive tract causes sterility. *Molecular Endocrinology*, *22*(10), 2336-2352. doi: 10.1210/me.2008-0142
- Nakatani, K., Maehama, T., Nishio, M., Goto, H., Kato, W., Omori, H., . . . Suzuki, A. (2016). Targeting the Hippo signalling pathway for cancer treatment. *The Journal of Biochemistry*, *161*(3), 237-244. doi: 10.1093/jb/mvw074
- Nardone, G., Oliver-De La Cruz, J., Vrbsky, J., Martini, C., Pribyl, J., Skládál, P., . . . Forte, G. (2017). YAP regulates cell mechanics by controlling focal adhesion assembly. *Nature communications*, *8*, 15321-15321. doi: 10.1038/ncomms15321
- Nargund, G., Datta, A. K. et Fauser, B. C. J. M. (2017). Mild stimulation for in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, *108*(4), 558-567. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.08.022
- Nilsson, E., Dole, G. et Skinner, M. K. (2009). Neurotrophin NT3 promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Reproduction*, *138*(4), 697-707. doi: 10.1530/rep-09-0179
- Nilsson, E., Parrott, J. A. et Skinner, M. K. (2001). Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *175*(1-2), 123-130. doi: 10.1016/s0303-7207(01)00391-4
- Nilsson, E., Rogers, N. et Skinner, M. K. (2007). Actions of anti-Mullerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. *Reproduction*, *134*(2), 209-221. doi: 10.1530/rep-07-0119

- Nilsson, E. E., Kezele, P. et Skinner, M. K. (2002). Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *188*(1-2), 65-73. doi: 10.1016/s0303-7207(01)00746-8
- Norris, R. P., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Cowan, A. E., Simon, A. M., Paul, D. L., . . . Jaffe, L. A. (2008). Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development*, *135*(19), 3229-3238. doi: 10.1242/dev.025494
- Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., . . . Jaffe, L. A. (2009). Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*, *136*(11), 1869-1878. doi: 10.1242/dev.035238
- Ojeda, S. R., Romero, C., Tapia, V. et Dissen, G. A. (2000). Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *163*(1-2), 67-71. doi: 10.1016/s0303-7207(99)00242-7
- Oktem, O. et Urman, B. (2010). Understanding follicle growth in vivo. *Human Reproduction*, *25*(12), 2944-2954. doi: 10.1093/humrep/deq275
- Orisaka, M., Miyazaki, Y., Shirafuji, A., Tamamura, C., Tsuyoshi, H., Tsang, B. K. et Yoshida, Y. (2021). The role of pituitary gonadotropins and intraovarian regulators in follicle development: A mini-review. *Reproductive Medicine and Biology*, *20*(2), 169-175. doi: 10.1002/rmb2.12371
- Orvis, G. D. et Behringer, R. R. (2007). Cellular mechanisms of Müllerian duct formation in the mouse. *Developmental Biology*, *306*(2), 493-504. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.03.027
- Ota, M. et Sasaki, H. (2008). Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development*, *135*, 4059-4069. doi: doi:10.1242/dev.027151
- Pan, B. et Li, J. (2019). The art of oocyte meiotic arrest regulation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *17*(1), 8. doi: 10.1186/s12958-018-0445-8
- Pangas, S. A. et Rajkovic, A. (2014). Chapter 21 - Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models (*Knobil and Neill's physiology of reproduction*: Academic Press.

- Panigone, S., Hsieh, M., Fu, M., Persani, L. et Conti, M. (2008). Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Molecular Endocrinology*, *22*(4), 924-936. doi: 10.1210/me.2007-0246
- Park, Hyun W., Kim, Young C., Yu, B., Moroishi, T., Mo, J.-S., Plouffe, Steven W., . . . Guan, K.-L. (2015). Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ. *Cell*, *162*(4), 780-794. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.013
- Park, J.-Y., Richard, F., Chun, S.-Y., Park, J.-H., Law, E., Horner, K., . . . Conti, M. (2003). Phosphodiesterase Regulation Is Critical for the Differentiation and Pattern of Gene Expression in Granulosa Cells of the Ovarian Follicle. *Molecular Endocrinology*, *17*(6), 1117-1130. doi: 10.1210/me.2002-0435
- Park, J. Y., Su, Y. Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S. L. et Conti, M. (2004). EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*, *303*(5658), 682-684. doi: 10.1126/science.1092463
- Parr, B. A. et McMahon, A. P. (1998). Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature*, *395*(6703), 707-710. doi: 10.1038/27221
- Parrott, J. A. et Skinner, M. K. (1999). Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, *140*(9), 4262-4271. doi: 10.1210/endo.140.9.6994
- Passaniti, A., Brusgard, J. L., Qiao, Y., Sudol, M. et Finch-Edmondson, M. (2017). Roles of RUNX in Hippo Pathway Signaling. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *962*, 435-448. doi: 10.1007/978-981-10-3233-2\_26
- Patel, S. H., Camargo, F. D. et Yimlamai, D. (2017). Hippo Signaling in the Liver Regulates Organ Size, Cell Fate, and Carcinogenesis. *Gastroenterology*, *152*(3), 533-545. doi: 10.1053/j.gastro.2016.10.047
- Peng, X. R., Hsueh, A. J., LaPolt, P. S., Bjersing, L. et Ny, T. (1991). Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology*, *129*(6), 3200-3207. doi: 10.1210/endo-129-6-3200

- Pepling, M. E. et Spradling, A. C. J. D. (1998). Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *125*(17), 3323-3328.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), e45.
- Piccolo, S., Dupont, S. et Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiological Reviews*, *94*(4), 1287-1312. doi: 10.1152/physrev.00005.2014
- Plewes, M. R., Hou, X., Zhang, P., Liang, A., Hua, G., Wood, J. R., . . . Davis, J. S. (2019). Yes-associated protein (YAP1) is required for proliferation and function of bovine granulosa cells in vitro\$. *Biology of Reproduction*. doi: 10.1093/biolre/ioz139
- Plouffe, S. W., Lin, K. C., Moore, J. L., 3rd, Tan, F. E., Ma, S., Ye, Z., . . . Guan, K.-L. (2018). The Hippo pathway effector proteins YAP and TAZ have both distinct and overlapping functions in the cell. *The Journal of biological chemistry*, *293*(28), 11230-11240. doi: 10.1074/jbc.RA118.002715
- Plouffe, S. W., Meng, Z., Lin, K. C., Lin, B., Hong, A. W., Chun, J. V. et Guan, K.-L. (2016). Characterization of Hippo Pathway Components by Gene Inactivation. *Molecular Cell*, *64*(5), 993-1008. doi: 10.1016/j.molcel.2016.10.034
- Pobbati, Ajaybabu V., Chan, Siew W., Lee, I., Song, H. et Hong, W. (2012). Structural and Functional Similarity between the Vgll1-TEAD and the YAP-TEAD Complexes. *Structure*, *20*(7), 1135-1140. doi: 10.1016/j.str.2012.04.004
- Pobbati, A. V., Han, X., Hung, A. W., Weiguang, S., Huda, N., Chen, G. Y., . . . Poulsen, A. (2015). Targeting the Central Pocket in Human Transcription Factor TEAD as a Potential Cancer Therapeutic Strategy. *Structure*, *23*(11), 2076-2086. doi: 10.1016/j.str.2015.09.009
- Pocaterra, A., Romani, P. et Dupont, S. (2020). YAP/TAZ functions and their regulation at a glance. *Journal of Cell Science*, *133*(2). doi: 10.1242/jcs.230425
- Portela, V. M., Zamberlam, G., Gonçalves, P. B. D., de Oliveira, J. F. C. et Price, C. A. (2011). Role of Angiotensin II in the Perioovulatory Epidermal Growth Factor-Like Cascade in Bovine Granulosa Cells In Vitro. *Biology of Reproduction*, *85*(6), 1167-1174. doi: 10.1095/biolreprod.111.094193 %J Biology of Reproduction

- Praskova, M., Xia, F. et Avruch, J. J. C. B. (2008). MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. *18*(5), 311-321.
- Przygodzka, E., Plewes, M. R. et Davis, J. S. (2021). Luteinizing Hormone Regulation of Inter-Organelle Communication and Fate of the Corpus Luteum. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(18). doi: 10.3390/ijms22189972
- Puri, P., Little-Ihrig, L., Chandran, U., Law, N. C., Hunzicker-Dunn, M. et Zeleznik, A. J. (2016). Protein Kinase A: A Master Kinase of Granulosa Cell Differentiation. *Scientific Reports*, *6*, 28132. doi: 10.1038/srep28132
- Rageh, M. A., Moussad, E. E., Wilson, A. K. et Brigstock, D. R. (2001). Steroidal regulation of connective tissue growth factor (CCN2; CTGF) synthesis in the mouse uterus. *Molecular pathology : MP*, *54*(5), 338-346. doi: 10.1136/mp.54.5.338
- Raj, N. et Bam, R. (2019). Reciprocal Crosstalk Between YAP1/Hippo Pathway and the p53 Family Proteins: Mechanisms and Outcomes in Cancer. *Front Cell Dev Biol*, *7*, 159. doi: 10.3389/fcell.2019.00159
- Rana, P., Kazmi, I., Singh, R., Afzal, M., Al-Abbasi, F. A., Aseeri, A., . . . Anwar, F. (2013). Ectopic pregnancy: a review. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *288*(4), 747-757. doi: 10.1007/s00404-013-2929-2
- Rashidian, J., Le Scolan, E., Ji, X., Zhu, Q., Mulvihill, M. M., Nomura, D. et Luo, K. (2015). Ski regulates Hippo and TAZ signaling to suppress breast cancer progression. *Sci Signal*, *8*(363), ra14. doi: 10.1126/scisignal.2005735
- Rayon, T., Menchero, S., Nieto, A., Xenopoulos, P., Crespo, M., Cockburn, K., . . . Manzanares, M. (2014). Notch and hippo converge on Cdx2 to specify the trophectoderm lineage in the mouse blastocyst. *Developmental Cell*, *30*(4), 410-422. doi: 10.1016/j.devcel.2014.06.019
- Reddy, P., Adhikari, D., Zheng, W., Liang, S., Hamalainen, T., Tohonen, V., . . . Liu, K. (2009). PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. *Human Molecular Genetics*, *18*(15), 2813-2824. doi: 10.1093/hmg/ddp217

- Reddy, P., Liu, L., Adhikari, D., Jagarlamudi, K., Rajareddy, S., Shen, Y., . . . Liu, K. (2008). Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*, *319*(5863), 611-613. doi: 10.1126/science.1152257
- Reddy, P., Shen, L., Ren, C., Boman, K., Lundin, E., Ottander, U., . . . Liu, K. (2005). Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Developmental Biology*, *281*(2), 160-170. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.02.013
- Redmer, D. A. et Reynolds, L. P. J. R. o. r. (1996). Angiogenesis in the ovary. *1*(3), 182-192.
- Reggiani, F., Gobbi, G., Ciarrocchi, A. et Sancisi, V. (2021). YAP and TAZ Are Not Identical Twins. *Trends in Biochemical Sciences*, *46*(2), 154-168. doi: 10.1016/j.tibs.2020.08.012
- Richards, J. S. (1980). Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiological Reviews*, *60*(1), 51-89. doi: 10.1152/physrev.1980.60.1.51
- Richards, J. S. et Ascoli, M. (2018). Endocrine, Paracrine, and Autocrine Signaling Pathways That Regulate Ovulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. doi: 10.1016/j.tem.2018.02.012
- Richards, J. S., Fan, H. Y., Liu, Z., Tsoi, M., Laguë, M. N., Boyer, A. et Boerboom, D. (2012). Either Kras activation or Pten loss similarly enhance the dominant-stable CTNNB1-induced genetic program to promote granulosa cell tumor development in the ovary and testis. *Oncogene*, *31*(12), 1504-1520. doi: 10.1038/onc.2011.341
- Richards, J. S., Ren, Y. A., Candelaria, N., Adams, J. E. et Rajkovic, A. (2018). Ovarian Follicular Theca Cell Recruitment, Differentiation, and Impact on Fertility: 2017 Update. *Endocrine Reviews*, *39*(1), 1-20. doi: 10.1210/er.2017-00164
- Richardson, B. E. et Lehmann, R. (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, *11*(1), 37-49. doi: 10.1038/nrm2815
- Rimon-Dahari, N., Yerushalmi-Heinemann, L., Alyagor, L. et Dekel, N. (2016). Ovarian Folliculogenesis. *Results and Problems in Cell Differentiation*, *58*, 167-190. doi: 10.1007/978-3-319-31973-5\_7



- Roberts, A. E., Arbogast, L. K., Friedman, C. I., Cohn, D. E., Kaumaya, P. T. et Danforth, D. R. (2007). Neutralization of Endogenous Vascular Endothelial Growth Factor Depletes Primordial Follicles in the Mouse Ovary1. *Biology of Reproduction*, 76(2), 218-223. doi: 10.1095/biolreprod.106.050880
- Robinson, A. (1887). The Position and Peritoneal Relations of the Mammalian Ovary. *Journal of Anatomy and Physiology*, 21(Pt 2), 169-179.
- Robinson, J. W., Zhang, M., Shuhaibar, L. C., Norris, R. P., Geerts, A., Wunder, F., . . . Jaffe, L. A. (2012). Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. *Developmental Biology*, 366(2), 308-316. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.04.019
- Robker, R., Russell, D., Espey, L. L., Lydon, J., O'malley, B. et Richards, J. J. P. o. t. N. A. o. S. (2000). Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. 97(9), 4689-4694.
- Robker, R. L., Hennebold, J. D. et Russell, D. L. (2018). Coordination of Ovulation and Oocyte Maturation: A Good Egg at the Right Time. *Endocrinology*, 159(9), 3209-3218. doi: 10.1210/en.2018-00485
- Robker, R. L. et Richards, J. S. (1998). Hormone-Induced Proliferation and Differentiation of Granulosa Cells: A Coordinated Balance of the Cell Cycle Regulators Cyclin D2 and p27Kip1. *Molecular Endocrinology*, 12(7), 924-940. doi: 10.1210/mend.12.7.0138
- Rodriguez, A., Tripurani, S. K., Burton, J. C., Clementi, C., Larina, I. et Pangas, S. A. (2016). SMAD Signaling Is Required for Structural Integrity of the Female Reproductive Tract and Uterine Function During Early Pregnancy in Mice. *Biology of Reproduction*, 95(2), 44. doi: 10.1095/biolreprod.116.139477
- Rognoni, E. et Walko, G. (2019). The Roles of YAP/TAZ and the Hippo Pathway in Healthy and Diseased Skin. *Cells*, 8(5). doi: 10.3390/cells8050411
- Roly, Z. Y., Backhouse, B., Cutting, A., Tan, T. Y., Sinclair, A. H., Ayers, K. L., . . . Smith, C. A. (2018). The cell biology and molecular genetics of Mullerian duct development. *Wiley interdisciplinary reviews - Developmental biology*, 7(3), e310. doi: 10.1002/wdev.310

- Rosenbluh, J., Nijhawan, D., Cox, A. G., Li, X., Neal, J. T., Schafer, E. J., . . . Hahn, W. C. (2012).  $\beta$ -Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell*, *151*(7), 1457-1473. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.026
- Ruberte, J., Carretero, A. et Navarro, M. (2017). *Morphological mouse phenotyping: anatomy, histology and imaging*. Elsevier.
- Russell, D. L., Doyle, K. M., Ochsner, S. A., Sandy, J. D. et Richards, J. S. J. J. o. B. C. (2003). Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. *278*(43), 42330-42339.
- Russell, D. L., Ochsner, S. A., Hsieh, M., Mulders, S. et Richards, J. S. (2003). Hormone-Regulated Expression and Localization of Versican in the Rodent Ovary. *Endocrinology*, *144*(3), 1020-1031. doi: 10.1210/en.2002-220434
- Saitou, M. et Yamaji, M. (2012). Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(11). doi: 10.1101/cshperspect.a008375
- Salter, B., Pray, C., Radford, K., Martin, J. G. et Nair, P. (2017). Regulation of human airway smooth muscle cell migration and relevance to asthma. *Respiratory Research*, *18*(1), 156. doi: 10.1186/s12931-017-0640-8
- Salvador, L. M., Maizels, E., Hales, D. B., Miyamoto, E., Yamamoto, H. et Hunzicker-Dunn, M. (2002). Acute signaling by the LH receptor is independent of protein kinase C activation. *Endocrinology*, *143*(8), 2986-2994. doi: 10.1210/endo.143.8.8976
- Samji, P., Rajendran, M. K., Warriar, V. P., Ganesh, A. et Devarajan, K. (2021). Regulation of Hippo signaling pathway in cancer: A MicroRNA perspective. *Cellular Signalling*, *78*, 109858. doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109858
- Sanchez, F. et Smitz, J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1822*(12), 1896-1912. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.05.013
- Sansores-Garcia, L., Bossuyt, W., Wada, K., Yonemura, S., Tao, C., Sasaki, H. et Halder, G. (2011). Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *EMBO Journal*, *30*(12), 2325-2335. doi: 10.1038/emboj.2011.157

- Santana Gonzalez, L., Rota, I. A., Artibani, M., Morotti, M., Hu, Z., Wietek, N., . . . Ahmed, A. A. (2021). Mechanistic Drivers of Müllerian Duct Development and Differentiation Into the Oviduct. *9*(269). doi: 10.3389/fcell.2021.605301
- Sato, Y., Cheng, Y., Kawamura, K., Takae, S. et Hsueh, A. J. (2012). C-type natriuretic peptide stimulates ovarian follicle development. *Molecular Endocrinology*, *26*(7), 1158-1166. doi: 10.1210/me.2012-1027
- Sen, A., Prizant, H., Light, A., Biswas, A., Hayes, E., Lee, H. J., . . . Hammes, S. R. (2014). Androgens regulate ovarian follicular development by increasing follicle stimulating hormone receptor and microRNA-125b expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(8), 3008-3013. doi: 10.1073/pnas.1318978111
- Seo, J. et Kim, J. (2018). Regulation of Hippo signaling by actin remodeling. *BMB Rep*, *51*(3), 151-156. doi: 10.5483/bmbrep.2018.51.3.012
- Shi, P., Feng, J. et Chen, C. (2015). Hippo pathway in mammary gland development and breast cancer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *47*(1), 53-59. doi: 10.1093/abbs/gmu114
- Shimoyama, T., Hiraoka, S., Takemoto, M., Koshizaka, M., Tokuyama, H., Tokuyama, T., . . . Yokote, K. (2010). CCN3 inhibits neointimal hyperplasia through modulation of smooth muscle cell growth and migration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *30*(4), 675-682. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.203356
- Shirafuta, Y., Tamura, I., Ohkawa, Y., Maekawa, R., Doi-Tanaka, Y., Takagi, H., . . . Sugino, N. (2021). Integrated Analysis of Transcriptome and Histone Modifications in Granulosa Cells During Ovulation in Female Mice. *Endocrinology*, *162*(9). doi: 10.1210/endocr/bqab128
- Si, Y., Ji, X., Cao, X., Dai, X., Xu, L., Zhao, H., . . . Zhao, B. (2017). Src Inhibits the Hippo Tumor Suppressor Pathway through Tyrosine Phosphorylation of Lats1. *Cancer Research*, *77*(18), 4868-4880. doi: 10.1158/0008-5472.Can-17-0391
- Sicinski, P., Donaher, J. L., Geng, Y., Parker, S. B., Gardner, H., Park, M. Y., . . . Weinberg, R. A. (1996). Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature*, *384*(6608), 470-474. doi: 10.1038/384470a0

- Siddappa, D., Beaulieu, É., Gévry, N., Roux, P. P., Bordignon, V. et Duggavathi, R. (2015). Effect of the transient pharmacological inhibition of Mapk3/1 pathway on ovulation in mice. *PLoS One*, *10*(3), e0119387. doi: 10.1371/journal.pone.0119387
- Silvis, M. R., Kreger, B. T., Lien, W. H., Klezovitch, O., Rudakova, G. M., Camargo, F. D., . . . Vasioukhin, V. (2011).  $\alpha$ -catenin is a tumor suppressor that controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator Yap1. *Sci Signal*, *4*(174), ra33. doi: 10.1126/scisignal.2001823
- Slemmons, K. K., Crose, L. E. S., Riedel, S., Sushnitha, M., Belyea, B. et Linardic, C. M. (2017). A Novel Notch-YAP Circuit Drives Stemness and Tumorigenesis in Embryonal Rhabdomyosarcoma. *Molecular Cancer Research*, *15*(12), 1777-1791. doi: 10.1158/1541-7786.Mcr-17-0004
- Song, Y., Fu, J., Zhou, M., Xiao, L., Feng, X., Chen, H. et Huang, W. (2016). Activated Hippo/Yes-Associated Protein Pathway Promotes Cell Proliferation and Anti-apoptosis in Endometrial Stromal Cells of Endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *101*(4), 1552-1561. doi: 10.1210/jc.2016-1120
- Sorrentino, G., Ruggeri, N., Specchia, V., Cordenonsi, M., Mano, M., Dupont, S., . . . Del Sal, G. (2014). Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nature Cell Biology*, *16*(4), 357-366. doi: 10.1038/ncb2936
- St-Jean, G., Boyer, A., Zamberlam, G., Godin, P., Paquet, M. et Boerboom, D. (2019). Targeted ablation of Wnt4 and Wnt5a in Mullerian duct mesenchyme impedes endometrial gland development and causes partial Mullerian agenesis. *Biology of Reproduction*, *100*(1), 49-60. doi: 10.1093/biolre/iory160
- St-Jean, G., Tsoi, M., Abedini, A., Levasseur, A., Rico, C., Morin, M., . . . Boerboom, D. (2019). Lats1 and Lats2 are required for the maintenance of multipotency in the Müllerian duct mesenchyme. *Development*, *146*(20), dev180430. doi: 10.1242/dev.180430
- St John, M. A., Tao, W., Fei, X., Fukumoto, R., Carcangiu, M. L., Brownstein, D. G., . . . Xu, T. (1999). Mice deficient of Lats1 develop soft-tissue sarcomas, ovarian tumours and pituitary dysfunction. *Nature Genetics*, *21*(2), 182-186. doi: 10.1038/5965

- Stamatiades, G. A. et Kaiser, U. B. (2018). Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 463, 131-141. doi: 10.1016/j.mce.2017.10.015
- Stancu, C. et Sima, A. (2001). Statins: mechanism of action and effects. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 5(4), 378-387. doi: 10.1111/j.1582-4934.2001.tb00172.x
- Sternberg, N. et Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *Journal of Molecular Biology*, 150(4), 467-486. doi: 10.1016/0022-2836(81)90375-2
- Stewart, C. A. et Behringer, R. R. (2012). Mouse oviduct development (*Mouse Development* (p. 247-262): Springer.
- Stewart, C. L. et Cullinan, E. B. J. D. g. (1997). Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors. 21(1), 91-101.
- Stocco, C., Telleria, C. et Gibori, G. (2007). The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine Reviews*, 28(1), 117-149. doi: 10.1210/er.2006-0022
- Stocco, C. O., Zhong, L., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Lau, L. F. et Gibori, G. J. J. o. B. C. (2000). Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -induced expression of 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase involves the transcription factor NUR77. 275(47), 37202-37211.
- Strakova, Z., Kruss, S., Morris, K. et Reed, J. (2010). Members of the Hippo Pathway Are Regulated in the Uterus During the Menstrual Cycle: Oxford University Press.
- Strakova, Z., Reed, J. et Ihnatovych, I. (2010). Human transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) is downregulated during decidualization. *Biology of Reproduction*, 82(6), 1112-1118. doi: 10.1095/biolreprod.109.081844
- Sun, T. et Diaz, F. J. (2019). Ovulatory signals alter granulosa cell behavior through YAP1 signaling. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1), 113. doi: 10.1186/s12958-019-0552-1
- Sun, T., Pepling, M. E. et Diaz, F. J. (2015). Lats1 Deletion Causes Increased Germ Cell Apoptosis and Follicular Cysts in Mouse Ovaries. *Biology of Reproduction*, 93(1), 22. doi: 10.1095/biolreprod.114.118604

- Surveyor, G. A., Wilson, A. K. et Brigstock, D. R. (1998). Localization of Connective Tissue Growth Factor during the Period of Embryo Implantation in the Mouse1. *Biology of Reproduction*, 59(5), 1207-1213. doi: 10.1095/biolreprod59.5.1207
- Swain, A., Narvaez, V., Burgoyne, P., Camerino, G. et Lovell-Badge, R. (1998). Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature*, 391(6669), 761-767. doi: 10.1038/35799
- Tan, G., Cao, X., Dai, Q., Zhang, B., Huang, J., Xiong, S., . . . Li, H. (2015). A novel role for microRNA-129-5p in inhibiting ovarian cancer cell proliferation and survival via direct suppression of transcriptional co-activators YAP and TAZ. *Oncotarget*, 6(11), 8676-8686. doi: 10.18632/oncotarget.3254
- Taylor, H. S., Vanden Heuvel, G. B. et Igarashi, P. (1997). A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biology of Reproduction*, 57(6), 1338-1345. doi: 10.1095/biolreprod57.6.1338
- Timmons, D., Montrief, T., Koyfman, A. et Long, B. (2019). Ovarian hyperstimulation syndrome: A review for emergency clinicians. *The American Journal of Emergency Medicine*, 37(8), 1577-1584. doi: 10.1016/j.ajem.2019.05.018
- Torre, L. A., Trabert, B., DeSantis, C. E., Miller, K. D., Samimi, G., Runowicz, C. D., . . . Siegel, R. L. (2018). Ovarian cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(4), 284-296. doi: 10.3322/caac.21456
- Torres, M., Gomez-Pardo, E., Dressler, G. R. et Gruss, P. (1995). Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development*, 121(12), 4057-4065.
- Vainio, S., Heikkila, M., Kispert, A., Chin, N. et McMahon, A. P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, 397(6718), 405-409. doi: 10.1038/17068
- Vanderhyden, B. C., Rouleau, A. et Armstrong, D. T. (1986). Effect of removal of the ovarian bursa of the rat on infundibular retrieval and subsequent development of ovulated oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 77(2), 393-399. doi: 10.1530/jrf.0.0770393

- Varelas, X., Sakuma, R., Samavarchi-Tehrani, P., Peerani, R., Rao, B. M., Dembowy, J., . . . Wrana, J. L. (2008). TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nature Cell Biology*, *10*(7), 837-848. doi: 10.1038/ncb1748
- Varelas, X., Samavarchi-Tehrani, P., Narimatsu, M., Weiss, A., Cockburn, K., Larsen, B. G., . . . Wrana, J. L. (2010). The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF-beta-SMAD pathway. *Developmental Cell*, *19*(6), 831-844. doi: 10.1016/j.devcel.2010.11.012
- Visser, J. A. et Themmen, A. P. N. (2005). Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *234*(1), 81-86. doi: 10.1016/j.mce.2004.09.008
- Vloeberghs, V., Peeraer, K., Pexsters, A. et D'Hooghe, T. (2009). Ovarian hyperstimulation syndrome and complications of ART. *Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology*, *23*(5), 691-709. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2009.02.006
- Wang, D., He, J., Dong, J., Meyer, T. F. et Xu, T. (2020). The HIPPO pathway in gynecological malignancies. *American Journal of Cancer Research*, *10*(2), 610-629.
- Wang, H. et Dey, S. K. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Reviews Genetics*, *7*(3), 185-199. doi: 10.1038/nrg1808
- Wear, H. M., McPike, M. J. et Watanabe, K. H. (2016). From primordial germ cells to primordial follicles: a review and visual representation of early ovarian development in mice. *J Ovarian Res*, *9*(1), 36. doi: 10.1186/s13048-016-0246-7
- West-Farrell, E. R., Xu, M., Gomberg, M. A., Chow, Y. H., Woodruff, T. K. et Shea, L. D. (2009). The Mouse Follicle Microenvironment Regulates Antrum Formation and Steroid Production: Alterations in Gene Expression Profiles<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, *80*(3), 432-439. doi: 10.1095/biolreprod.108.071142
- Wong, J. S., Meliambro, K., Ray, J. et Campbell, K. N. (2016). Hippo signaling in the kidney: the good and the bad. *American journal of physiology. Renal physiology*, *311*(2), F241-F248. doi: 10.1152/ajprenal.00500.2015

- Woodruff, T. K. et Shea, L. D. (2011). A new hypothesis regarding ovarian follicle development: ovarian rigidity as a regulator of selection and health. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(1), 3-6. doi: 10.1007/s10815-010-9478-4
- Wu, Y., Aegerter, P., Nipper, M., Ramjit, L., Liu, J. et Wang, P. (2021). Hippo Signaling Pathway in Pancreas Development. *Front Cell Dev Biol*, 9, 663906. doi: 10.3389/fcell.2021.663906
- Wu, Z. et Guan, K. L. (2021). Hippo Signaling in Embryogenesis and Development. *Trends in Biochemical Sciences*, 46(1), 51-63. doi: 10.1016/j.tibs.2020.08.008
- Xia, Y., Chang, T., Wang, Y., Liu, Y., Li, W., Li, M. et Fan, H. Y. (2014). YAP promotes ovarian cancer cell tumorigenesis and is indicative of a poor prognosis for ovarian cancer patients. *PloS One*, 9(3), e91770. doi: 10.1371/journal.pone.0091770
- Xiang, C., Li, J., Hu, L., Huang, J., Luo, T., Zhong, Z., . . . Zheng, L. (2015). Hippo signaling pathway reveals a spatio-temporal correlation with the size of primordial follicle pool in mice. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 35(3), 957-968. doi: 10.1159/000369752
- Xie, H., Wu, L., Deng, Z., Huo, Y. et Cheng, Y. (2018). Emerging roles of YAP/TAZ in lung physiology and diseases. *Life Sciences*, 214, 176-183. doi: 10.1016/j.lfs.2018.10.062
- Xin, M., Kim, Y., Sutherland, L. B., Murakami, M., Qi, X., McAnally, J., . . . Olson, E. N. (2013). Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(34), 13839-13844. doi: 10.1073/pnas.1313192110
- Xin, M., Kim, Y., Sutherland, L. B., Qi, X., McAnally, J., Schwartz, R. J., . . . Olson, E. N. (2011). Regulation of insulin-like growth factor signaling by Yap governs cardiomyocyte proliferation and embryonic heart size. *Science Signaling*, 4(196), ra70. doi: 10.1126/scisignal.2002278
- Xu, G., Wang, Y., Li, W., Cao, Y., Xu, J., Hu, Z., . . . Sun, Y. (2018). COX-2 Forms Regulatory Loop with YAP to Promote Proliferation and Tumorigenesis of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Neoplasia*, 20(4), 324-334. doi: 10.1016/j.neo.2017.12.004
- Xu, M., Xiao, J., Chen, M., Yuan, L., Li, J., Shen, H. et Yao, S. (2018). miR1495p promotes chemotherapeutic resistance in ovarian cancer via the inactivation of the Hippo signaling pathway. *International Journal of Oncology*, 52(3), 815-827. doi: 10.3892/ijo.2018.4252



- Xu, M. Z., Chan, S. W., Liu, A. M., Wong, K. F., Fan, S. T., Chen, J., . . . Luk, J. M. (2011). AXL receptor kinase is a mediator of YAP-dependent oncogenic functions in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, *30*(10), 1229-1240. doi: 10.1038/onc.2010.504
- Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R. A. et Yu, W. (1995). Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development*, *121*(4), 1053-1063.
- Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Elvin, J. A., Carino, C., . . . Matzuk, M. M. (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology*, *15*(6), 854-866. doi: 10.1210/mend.15.6.0662
- Yang, W., Han, W., Qin, A., Wang, Z., Xu, J. et Qian, Y. (2018). The emerging role of Hippo signaling pathway in regulating osteoclast formation. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(6), 4606-4617. doi: 10.1002/jcp.26372
- Yimlamai, D., Christodoulou, C., Galli, G. G., Yanger, K., Pepe-Mooney, B., Gurung, B., . . . Camargo, F. D. (2014). Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell*, *157*(6), 1324-1338. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.060
- Yin, F., Yu, J., Zheng, Y., Chen, Q., Zhang, N. et Pan, D. (2013). Spatial organization of Hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor Merlin/NF2. *Cell*, *154*(6), 1342-1355. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.025
- Ying, Y., Qi, X. et Zhao, G.-Q. J. P. o. t. N. A. o. S. (2001). Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *98*(14), 7858-7862.
- Young, B., O'Dowd, G. et Woodford, P. (2015). *Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater*. De Boeck Supérieur.
- Yu, C., Ji, S. Y., Dang, Y. J., Sha, Q. Q., Yuan, Y. F., Zhou, J. J., . . . Fan, H. Y. (2016). Oocyte-expressed yes-associated protein is a key activator of the early zygotic genome in mouse. *Cell Research*, *26*(3), 275-287. doi: 10.1038/cr.2016.20

- Yu, F. X., Meng, Z., Plouffe, S. W. et Guan, K. L. (2015). Hippo pathway regulation of gastrointestinal tissues. *Annual Review of Physiology*, 77, 201-227. doi: 10.1146/annurev-physiol-021014-071733
- Yu, F. X., Zhang, Y., Park, H. W., Jewell, J. L., Chen, Q., Deng, Y., . . . Guan, K. L. (2013). Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation. *Genes & Development*, 27(11), 1223-1232. doi: 10.1101/gad.219402.113
- Yu, F. X., Zhao, B. et Guan, K. L. (2015). Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell*, 163(4), 811-828. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.044
- Yu, F. X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J. L., Lian, I., Wang, L. H., . . . Guan, K. L. (2012). Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell*, 150(4), 780-791. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.037
- Zamberlam, G., Lapointe, E., Abedini, A., Rico, C., Godin, P., Paquet, M., . . . Boerboom, D. (2019). SFRP4 is a negative regulator of ovarian follicle development and female fertility. *Endocrinology*. doi: 10.1210/en.2019-00212
- Zanconato, F., Cordenonsi, M. et Piccolo, S. (2016). YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell*, 29(6), 783-803. doi: 10.1016/j.ccell.2016.05.005
- Zanconato, F., Forcato, M., Battilana, G., Azzolin, L., Quaranta, E., Bodega, B., . . . Piccolo, S. (2015). Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nature Cell Biology*, 17(9), 1218-1227. doi: 10.1038/ncb3216
- Zhang, H., Risal, S., Gorre, N., Busayavalasa, K., Li, X., Shen, Y., . . . Liu, K. J. C. B. (2014). Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. 24(21), 2501-2508.
- Zhang, J., Ji, J. Y., Yu, M., Overholtzer, M., Smolen, G. A., Wang, R., . . . Haber, D. A. (2009). YAP-dependent induction of amphiregulin identifies a non-cell-autonomous component of the Hippo pathway. *Nature Cell Biology*, 11(12), 1444-1450. doi: 10.1038/ncb1993
- Zhang, M., Su, Y. Q., Sugiura, K., Xia, G. et Eppig, J. J. (2010). Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science*, 330(6002), 366-369. doi: 10.1126/science.1193573

- Zhang, Q., Han, X., Chen, J., Xie, X., Xu, J., Zhao, Y., . . . Xia, Z. (2018). Yes-associated protein (YAP) and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) mediate cell density-dependent proinflammatory responses. *Journal of Biological Chemistry*, 293(47), 18071-18085. doi: 10.1074/jbc.RA118.004251
- Zhang, W., Gao, Y., Li, P., Shi, Z., Guo, T., Li, F., . . . Wang, Z. J. C. r. (2014). VGLL4 functions as a new tumor suppressor in lung cancer by negatively regulating the YAP-TEAD transcriptional complex. *24(3)*, 331-343.
- Zhang, X., George, J., Deb, S., Degoutin, J. L., Takano, E. A., Fox, S. B., . . . Harvey, K. F. (2011). The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, is an ovarian cancer oncogene. *Oncogene*, 30(25), 2810-2822. doi: 10.1038/onc.2011.8
- Zhang, Z., Lin, Z., Zhou, Z., Shen, H. C., Yan, S. F., Mayweg, A. V., . . . Hu, T. (2014). Structure-Based Design and Synthesis of Potent Cyclic Peptides Inhibiting the YAP-TEAD Protein-Protein Interaction. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 5(9), 993-998. doi: 10.1021/ml500160m
- Zhao, B., Li, L., Lu, Q., Wang, L. H., Liu, C.-Y., Lei, Q. et Guan, K.-L. (2011). Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *25(1)*, 51-63.
- Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.-Y. et Guan, K.-L. (2010). A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF $\beta$ -TRCP. *24(1)*, 72-85.
- Zhao, B., Li, L., Wang, L., Wang, C. Y., Yu, J. et Guan, K. L. (2012). Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes & Development*, 26(1), 54-68. doi: 10.1101/gad.173435.111
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., . . . Guan, K. L. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & Development*, 21(21), 2747-2761. doi: 10.1101/gad.1602907
- Zhao, B., Ye, X., Yu, J., Li, L., Li, W., Li, S., . . . Guan, K. L. (2008). TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes & Development*, 22(14), 1962-1971. doi: 10.1101/gad.1664408

- Zhao, F., Franco, H. L., Rodriguez, K. F., Brown, P. R., Tsai, M. J., Tsai, S. Y. et Yao, H. H. (2017). Elimination of the male reproductive tract in the female embryo is promoted by COUP-TFI in mice. *Science*, 357(6352), 717-720. doi: 10.1126/science.aai9136
- Zheng, Y., Liu, B., Wang, L., Lei, H., Prieto, K. D. P. et Pan, D. J. C. r. (2017). Homeostatic control of Hpo/MST kinase activity through autophosphorylation-dependent recruitment of the STRIPAK PP2A phosphatase complex. *21(12)*, 3612-3623.
- Zhong, L., Parmer, T. G., Robertson, M. C. et Gibori, G. (1997). Prolactin-Mediated Inhibition of 20 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Gene Expression and the Tyrosine Kinase System. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 235(3), 587-592. doi: 10.1006/bbrc.1997.6833
- Zhou, Q., Li, L., Zhao, B. et Guan, K.-L. (2015). The hippo pathway in heart development, regeneration, and diseases. *Circulation Research*, 116(8), 1431-1447. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303311
- Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A. H., Tanaseichuk, O., . . . Chanda, S. K. (2019). Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun*, 10(1), 1523. doi: 10.1038/s41467-019-09234-6
- Zhu, Q., Le Scolan, E., Jahchan, N., Ji, X., Xu, A. et Luo, K. (2016). SnoN Antagonizes the Hippo Kinase Complex to Promote TAZ Signaling during Breast Carcinogenesis. *Developmental Cell*, 37(5), 399-412. doi: 10.1016/j.devcel.2016.05.002
- Zimmermann, R. C., Hartman, T., Kavic, S., Pauli, S. A., Bohlen, P., Sauer, M. V. et Kitajewski, J. (2003). Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *Journal of Clinical Investigation*, 112(5), 659-669. doi: 10.1172/jci18740