

Université de Montréal

Élucidation des rôles des voies Wnt et Hippo dans le développement et la fonction du tractus reproducteur femelle chez la souris

Par
Guillaume St-Jean

Département de biomédecine vétérinaire
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae doctor* (Ph. D.)
en sciences vétérinaires, option reproduction

Novembre 2019
© Guillaume St-Jean, 2019

Université de Montréal
Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée

Élucidation des rôles des voies Wnt et Hippo dans le développement et la fonction du tractus reproducteur femelle chez la souris

Présentée par

Guillaume St-Jean

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

M. Christopher Price

Président-rapporteur

M. Derek Boerboom

Directeur de recherche

Mme Marilène Paquet

Codirectrice de recherche

Mme Sylvie Girard

Membre du jury

Mme Clémence Belleannée

Examinatrice externe

RÉSUMÉ

Le développement du tractus reproducteur femelle est issu de la coordination minutieuse de nombreuses voies de signalisation régulant les processus de prolifération, différenciation et d'apoptose cellulaire durant l'embryogenèse. Les voies Wnt et Hippo se démarquent à cet égard. L'activation de la voie Wnt, via des ligands spécifiques, participe à la stabilisation et l'augmentation de l'activité transcriptionnelle du coactivateur de transcription β -catenin. La voie Hippo, pour sa part, ne possède aucun de ligand spécifique. L'inactivation de la voie Hippo (via les kinases Lats1 et Lats2) entraîne la stabilisation des coactivateurs de la transcription YAP/TAZ et l'augmentation de leur activité transcriptionnelle. Plusieurs évidences suggèrent notamment la possibilité de redondance fonctionnelle entre certains ligands de la voie Wnt, dont Wnt4 et Wnt5a, dans le développement du tractus reproducteur femelle. Cette avenue demeure toutefois peu étudiée. L'implication de la voie Hippo n'a pas été rapportée dans le développement du tractus reproducteur femelle. Toutefois, les nombreuses interactions rapportées dans la littérature entre les deux voies suggèrent un rôle méconnu de la voie Hippo. L'objectif de ce projet était donc d'élucider les rôles de *Wnt4*, *Wnt5a*, *Lats1* et *Lats2* dans le mésenchyme de Müller et le développement de l'utérus. Les résultats de notre première étude ont confirmé la fonction partiellement redondante de *Wnt4* et *Wnt5a* dans le développement de l'utérus. Notre modèle est notamment caractérisé par des anomalies développementales ainsi qu'une perte de fonction utérine associée à des anomalies de décidualisation *in vivo* et une diminution de la viabilité des concepti. Les résultats de notre seconde étude ont confirmé les rôles redondants de *Lats1* et *Lats2* dans le maintien de la multipotentialité des cellules mésenchymateuses müllériennes. Une différenciation hâtive des cellules mésenchymateuses müllériennes en myofibroblastes via, entre autres, l'expression du gène cible *Ctgf*, a été observée. Nos résultats additionnels n'ont pu mettre en évidence une interaction potentielle entre les voies Wnt et Hippo pouvant expliquer l'apparition des phénotypes. Ces deux études permettent de confirmer certains rôles connus et d'établir de nouveaux rôles de ces voies dans le développement des canaux de Müller. Ils pourront aussi établir les fondements de modèles permettant l'étude de différentes pathologies utérines et l'identification de cibles thérapeutiques.

Mots clés : Canaux de Müller, Utérus, voie Wnt, voie Hippo, β -catenin, *Wnt4*, *Wnt5a*, *Lats1*, *Lats2*, YAP, TAZ, myofibroblastes

ABSTRACT

The development of the female reproductive tract arises from the coordination of numerous signaling pathways regulating processes such as proliferation, differentiation and apoptosis during embryogenesis. The Wnt and Hippo pathways are known to be involved in these processes. Wnt pathway activation, via its specific ligands, results in the stabilisation and increased transcriptional activity of β -catenin. The Hippo pathway does not possess any specific ligands. In contrast to Wnt, inactivation of the Hippo pathway (via Lats1 and Lats2 kinases) is required for the stabilization and increased activity of the transcriptional coactivators YAP and TAZ. The Wnt pathway is known to be involved in the development of the female reproductive tract. Further evidence also suggests the possibility of functional redundancy amongst certain WNT ligands such as *Wnt4* and *Wnt5a*. The Hippo pathway is not known to be implicated in the development of the female reproductive tract. However, numerous interactions have been reported between both pathways, suggesting a possible unknown role of Hippo in that context. The objective of this project was to elucidate the roles of *Wnt4*, *Wnt5a*, *Lats1* and *Lats2* in the Müllerian mesenchyme and the development of the uterus. Results from our first study confirmed the partially redundant roles of *Wnt4* and *Wnt5a* in the development of the uterus. Our model was notably characterized by developmental abnormalities and loss of uterine functions resulting in *in vivo* decidualization defects and loss of conceptus viability. Results from our second study confirmed the redundant roles of *Lats1* and *Lats2* in the maintenance of Müllerian mesenchymal cell multipotency. We observed premature differentiation of Müllerian mesenchymal cells into myofibroblasts in absence of both *Lats1* and *Lats2*. These changes were in part due to the increased expression of the target gene *Ctgf*. Our additional results could not demonstrate any potential interactions between the Wnt and Hippo pathways that could explain the phenotypic changes. In conclusion, our studies confirmed and further discovered novel roles of these pathways in the development of the Müllerian ducts. These models could also lead to better understanding of the pathophysiology of certain uterine diseases and the discovery of potential therapeutic approaches.

Key words : Müllerian ducts, Uterus, Wnt pathway, Hippo pathway, β -catenin, *Wnt4*, *Wnt5a*, *Lats1*, *Lats2*, YAP, TAZ, myofibroblasts

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	3
ABSTRACT.....	4
TABLE DES MATIÈRES	5
LISTE DES TABLEAUX.....	10
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	13
REMERCIEMENTS.....	18
CHAPITRE 1. REVUE DE LITTÉRATURE	19
1.1 ANATOMIE DE L'UTÉRUS.....	20
1.2 DÉVELOPPEMENT DE L'UTÉRUS.....	21
1.2.1 Formation du mésonéphros et des canaux de Wolff	22
1.2.2 Développement des gonades primitives	22
1.2.3 Formation des canaux de Müller	24
1.2.4 Différenciation sexuelle.....	26
1.2.5 Régression des canaux de Wolff	27
1.2.6 Différenciation des canaux de Müller	28
1.3 RÉGULATION HORMONALE DU CYCLE OESTRAL.....	30
1.4 PHYSIOLOGIE DE L'UTÉRUS.....	31
1.4.1 Fécondation	31
1.4.2 Nidation	32
1.4.3 Décidualisation	33
1.4.4 Placentation	34
1.4.5 Gestation et parturition.....	35
1.5 VOIE WNT	38
1.5.1 Introduction	38
1.5.2 Découverte de la voie Wnt	38

1.5.3 Composantes de la voie Wnt chez les mammifères	39
1.5.4 Mécanismes de la voie Wnt.....	39
1.5.4.1 La voie canonique (Wnt/ β -catenin)	40
1.5.4.2 La voie non canonique	41
1.5.5 Expression générale de la voie Wnt dans l'utérus murin	42
1.5.5.1 Expression dans les canaux de Müller	42
1.5.5.2 Expression dans l'utérus adulte	43
1.5.5.3 Expression durant la gestation	43
1.5.6 Rôles des WNTs dans le développement et la fonction de l'utérus	44
1.5.6.1 Rôles de Wnt4.....	44
1.5.6.2 Rôles de Wnt5a.....	45
1.5.6.3 Rôles de Wnt7a.....	45
1.5.6.4 Rôles additionnels.....	47
1.5.7 Implication de la voie Wnt dans les maladies utérines.....	48
1.5.7.1 Cancers utérins.....	48
1.5.7.2 Endométriose	50
1.5.7.3 Le syndrome Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser	51
1.6 VOIE HIPPO.....	52
1.6.1 Introduction	52
1.6.2 Découverte de la voie Hippo	52
1.6.3 Composantes de la voie Hippo chez les mammifères	53
1.6.3.1 MST1 et MST2	53
1.6.3.2 LATS1 et LATS2.....	54
1.6.3.3 YAP et TAZ.....	55
1.6.3.4 TEAD.....	56
1.6.4 Mécanisme de la voie Hippo	57

1.6.5 Expression générale de la voie Hippo dans l’utérus murin	58
1.6.6 Rôles de la voie Hippo dans le développement et la fonction utérine.....	59
1.6.7 Implications de la voie Hippo dans les maladies utérines	60
1.6.7.1 Cancers utérins.....	60
1.6.7.2 Endométriose	60
1.7 COORDINATIONS POTENTIELLES DES VOIES WNT ET HIPPO DANS LE DÉVELOPPEMENT ET LA FONCTION NORMALE DE L’UTÉRUS ET LE DÉVELOPPEMENT DE PATHOLOGIES UTÉRINES (PRÉLUDE AU PROJET).....	62
1.7.1 Les voies Wnt et Hippo peuvent-elles interagir et contribuer au développement et à la fonction de l’utérus ?	62
1.7.2 Quelle pourrait être l’implication de ces interactions dans le développement de processus pathologiques utérins ?	65
1.7.2.1 Qu’est-ce que la fibrose ?	65
1.7.2.2 Quelle est l’implication de la fibrose dans les maladies utérines ?.....	66
1.7.2.3 Les voies Wnt, Hippo et TGF- β sont reconnues pour réguler conjointement la fibrose	66
1.7.3 L’invalidation conditionnelle de gènes clés de ces voies permettrait-elle de répondre à ces questions ?	68
CHAPITRE 2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	70
2.1 HYPOTHÈSES	71
2.2 OBJECTIFS	71
CHAPITRE 3. ARTICLE 1	72
3.1 ABSTRACT.....	74
3.2 INTRODUCTION.....	75
3.3 MATERIALS AND METHODS	77
3.4 RESULTS.....	81
3.5 DISCUSSION	86

3.6 ACKNOWLEDGEMENTS	89
3.7 FUNDING.....	89
3.8 CONFLICT OF INTEREST STATEMENT.....	89
3.9 REFERENCES.....	90
CHAPITRE 4. ARTICLE 2	107
4.1 ABSTRACT	109
4.2 INTRODUCTION.....	110
4.3 MATERIALS AND METHODS	112
4.4 RESULTS.....	117
4.5 DISCUSSION	122
4.6 ACKNOWLEDGEMENTS	126
4.7 FUNDING.....	126
4.8 CONFLICT OF INTEREST STATEMENT.....	126
4.9 REFERENCES.....	126
CHAPITRE 5. DISCUSSION	153
5.1 DISCUSSIONS GÉNÉRALES.....	154
5.1.1 Les limites du système cre-lox	154
5.1.1.1 Fuite de la recombinaise.	154
5.1.1.2 Toxicité de la recombinaise	155
5.1.1.3 Mosaïcisme et efficacité de la recombinaison	156
5.1.2 L'étude paradoxale du système reproducteur.....	157
5.2 ÉLÉMENTS DE DISCUSSIONS ADDITIONNELS (PROJETS)	158
5.2.1 <i>Wnt4</i> et <i>Wnt5a</i> effectuent des rôles redondants dans le développement de l'utérus	158
5.2.1.1 Facteurs limitants (projet Wnt)	158

5.2.1.3 Pistes de solution (projet Wnt).....	159
5.2.2 <i>Lats1</i> et <i>Lats2</i> effectuent des rôles redondants dans le développement de l'utérus	160
5.2.2.1 Facteurs limitants (Projet Hippo).....	160
5.2.2.2 Pistes de solution (Projet Hippo)	162
5.3 Y A-T-IL DES INTERACTIONS NOTABLES ENTRE LES DEUX VOIES DANS LE DÉVELOPPEMENT DE L'UTÉRUS ?	162
RÉFÉRENCES	165

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Gènes additionnels de la famille Wnt impliqués dans le développement et la fonction de l'utérus.	48
Article 1	
TABLE 1. Fertility Trial.	106
TABLE 2. Ovulation rate.....	106
SUPPLEMENTAL TABLE 1. RT-qPCR primer sequences.....	106
Article 2	
TABLE 1. Microarray; top 20 upregulated genes in <i>Lats1</i> ^{flox/flox} ; <i>Lats2</i> ^{flox/flox} ; <i>Amhr2</i> ^{cre/+} female mice	148
TABLE 2. Microarray; top 20 downregulated genes in <i>Lats1</i> ^{flox/flox} ; <i>Lats2</i> ^{flox/flox} ; <i>Amhr2</i> ^{cre/+} female mice	149
SUPPLEMENTAL TABLE 1. Fertility trial.	150
SUPPLEMENTAL TABLE 2. Tumor marker immunohistochemistry analyses.	150
SUPPLEMENTAL TABLE 3. qPCR primers.....	151
SUPPLEMENTAL TABLE 4. ChIP primers	152

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Morphologie macroscopique et histologique de l'utérus adulte chez la souris.	20
Figure 2. Signaux dictant le développement du tractus reproducteur.....	21
Figure 3. Chronologie du développement du tractus reproducteur femelle chez la souris lors de l'embryogenèse.....	22
Figure 4. Étapes du développement des canaux de Müller.....	25
Figure 5. Morphologie histologique des canaux de Müller (E14.5).....	25
Figure 6. Morphologie placentaire.....	35
Figure 7. Résumé des signaux contrôlant la parturition chez la souris.....	37
Figure 8. Mécanismes de la voie Wnt.....	42
Figure 9. Mécanisme de la voie Hippo.....	58
Figure 10. Interactions entre les voies Wnt et Hippo.....	64
Figure 11. Interactions entre les voies Wnt, Hippo et TGF- β dans le contexte de la fibrose. ..	68

Article 1

Figure 1. Histopathological examination of the ovaries of six week-old <i>Wnt4</i> ^{flox/flox} ; <i>Amhr2</i> ^{cre/+} and <i>Wnt4</i> ^{flox/flox} ; <i>Wnt5a</i> ^{flox/flox} ; <i>Amhr2</i> ^{cre/+} mice.....	95
Figure 2. Serum progesterone and estradiol levels in adult <i>Wnt4</i> ^{flox/flox} ; <i>Wnt5a</i> ^{flox/flox} ; <i>Amhr2</i> ^{cre/+} mice and age-matched controls.....	96
Figure 3. Evaluation of the uteri of 56 day-old <i>Wnt4</i> ^{flox/flox} ; <i>Wnt5a</i> ^{flox/flox} ; <i>Amhr2</i> ^{cre/+} mice.....	97
Figure 4. Morphometric analyses of the uteri of <i>Wnt4</i> ^{flox/flox} ; <i>Wnt5a</i> ^{flox/flox} ; <i>Amhr2</i> ^{cre/+} mice.....	98
Figure 5. Evaluation of uterine function in <i>Wnt4</i> ^{flox/flox} ; <i>Wnt5a</i> ^{flox/flox} ; <i>Amhr2</i> ^{cre/+} mice.....	99
Figure 6. Decidualization of uterine stromal cells <i>in vitro</i>	100
Figure 7. Müllerian agenesis in <i>Wnt4</i> ^{flox/flox} ; <i>Wnt5a</i> ^{flox/flox} ; <i>Amhr2</i> ^{cre/+} mice.....	101
Supplemental Figure 1. RT-qPCR analysis of <i>Wnt4</i> and <i>Wnt5a</i> mRNA levels in granulosa cells obtained from immature, eCG-treated mice.....	103
Supplemental Figure 2. Quantitative analysis of ovarian follicles in 42 day-old (A) and 8 month-old (B) mice.....	104

Article 2

Figure 1. Loss of Hippo signaling result in severe developmental defects of the female reproductive tract. 134

Figure 2. Loss of Hippo signaling causes Müllerian mesenchyme cells to commit to the myofibroblast fate. 135

Figure 3. Ovarian phenotypic changes in *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice..... 137

Figure 4. Reproductive tract and testicular defects in male *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice..... 138

Figure 5. Loss of Hippo signaling does not alter decidualization or cell fate in adult endometrial stromal cells. 140

Figure 6. YAP/TAZ-dependent induction of Hippo target genes and the myofibroblast genetic program in female *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice..... 141

Figure 7. Chromatin immunoprecipitation analyses..... 143

Supplemental figure 1. Immunohistochemical analyses of Hippo core component (LATS1, LATS2, YAP, TAZ, phosphoYAP) expression during female reproductive tract development. 144

Supplemental figure 2. Evaluation of knockout efficiency in the female *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} reproductive tract. 145

Supplemental figure 3. Representative tumor marker immunohistochemistry photomicrographs. 146

Supplemental figure 4. Microarray gene ontology analysis..... 147

LISTE DES ABRÉVIATIONS

20 α -HSD :	20-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase
3 β -HSD :	3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase
AGC :	Protéines kinases A, G et C
Amh :	Anti-Müllerian hormone
Amot:	Angiomotin
AMPc:	Adénosine monophosphate cyclique
Ankrd1:	cardiac Adriamycin-responsive protein
APC:	Adenomatous polyposis coli
ARN :	Acide ribonucléique
α -SMA:	α -Smooth muscle actin
Bhlhe40:	Basic Helix-Loop-Helix family member E40
Bmp2/4 :	Bone morphogenic protein 2/4
BrdU:	Bromo deoxyuridine
β -TrCP :	β -Transducin repeat containing E3 ubiquitin protein
Birc5:	Baculoviral IAP repeat containing 5
CAMKII:	Calmodulin-dependent protein kinase II
CD44:	Cluster of differentiation 44 (homing cell adhesion molecule)
CDC42:	Cell division control protein 42 homolog
Cdh1:	Cadherin-1 (E-cadherin)
C-EBP β :	CCAAT/enhancer-binding protein beta
ChIP:	Chromatin immunoprecipitation
CK:	Cytokeratin
CK1 $\alpha/\epsilon/\gamma$:	Caséine kinase 1
CCL12:	Chemokine ligand 12
C-myc :	Cellular virus myelocytomatosis
C-jun :	Cellular Jun proto-oncogene
COUP-TFII:	COUP transcription factor 2
Cox1/2 :	Cyclooxygenase 1/2
Ctgf:	Connective tissue growth factor
CTNNB1:	β -catenin
CXCR9:	Chemokine receptor 9
Cyp19 :	Aromatase cytochrome p450
Cyr61:	Cysteine-rich angiogenic protein 61
Dach2 :	Dachshund homolog 2
DAAM1:	Disheveled-associated activator of morphogenesis 1
DEP:	Domaine Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin
Dkk1/3 :	Dickkopf-related protein 1/3
Dmrt :	Doublesex and mab-3 related transcription factor
Dsh :	Dishevelled
E :	Jour embryonnaire
eCG :	Equine chorionic gonadotropin
EDF1 :	Endothelial differentiation related factor 1
Enc1 :	Ectoderm-neural cortex protein 1

Enpp2 : Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2
 Epha6 : Ephrin type-A receptor 6
 Ephb2 : Ephrin type-b receptor 2
 Era/β : Estrogen receptor α/β
 ErbB-4: Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4
 ERE: Estrogen response element
 Fam180a: Family with sequence similarity 180 member A
 F-box: Domaine F-box
 Fgf7/9/10 : Fibroblast growth factor 7/9/10
 Foxa2: Forkhead box A2
 Foxl2 : Forkhead box L2
 FoxO1: Forkhead box protein O1
 FoxP1: Forkhead box protein P1
 FSH : Follicle-stimulating hormone
 Fst : Follistatin
 Fzd : Frizzled
 G2-M: Gap2/mitose phase
 Gadd45g: Growth arrest and DNA damage inducible gamma
 Gata4 : GATA binding protein 4
 GCK-II: Germinal center kinase II
 Gdnf: Glial cell-derived neurotrophic factor
 Gdpd3: Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3
 GFP: Green fluorescent protein
 GnRH: Gonadotropin-releasing hormone
 GPCR: G protein-coupled receptors
 GPR50: G protein-coupled receptor 50
 Gria1: Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1
 Gsk3: Glycogen synthase kinase 3
 Gstm7: Glutathione S-transferase Mu7
 Hco3: Bicarbonate de sodium
 H&E: Hematoxylin and eosin
 HEPS: Hematoxylin-eosin-phloxine-saffron
 Hoxa9-13: Homeobox A 9/10/11/13
 Hpo : Hippo
 ICAT: Inhibitor of β-catenin
 Id1: Inhibitor of DNA binding 1
 Igfbp-1: Insulin-like growth factor-binding protein 1
 IL1β: Interleukin 1β
 Inhba: Inhibin beta A
 IP3: Inositol triphosphate
 Irs1: Insulin receptor substrate 1
 JNK: C-Jun N-Terminal kinase
 KO: Knockout
 Lats1/2: Large tumor suppressor kinase ½
 LCN2: Lipocalin 2
 Lef1: Lymphoid enhancer-binding factor 1

Lgr4:	Leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 4
LH:	Luteinizing hormone
Lif:	Leukemia inhibitory factor
Lim1:	LIM homeobox 1
LoxP:	Locus of X-over P1
Lrp5/6:	LDL-R-Related Protein 5/6
LTR:	Long terminal repeat
Mats	Mob as tumor suppressor
Mmp:	Matrix metalloproteinases
Mob1:	MOB kinase activator
MOI:	Multiplicity of infection
MPA:	Medroxyprogesterone acetate
MRKH:	Syndrome Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser
Mst1/2:	Macrophage stimulating 1/2
Msx1/2:	Msh homeobox ½
Musk:	Muscle associated receptor tyrosine kinase
Mybpc1:	Myosin binding protein C
Myc:	Protéine proto-oncogène myc
Nanog:	Nanog homeobox
NFAT:	Nuclear factor of activated T-cells
NF-κβ:	Nuclear factor-kappa beta
NLK:	Nemo like kinase
Notum:	Palmitoleoyl-protein carboxylesterase
Nr3c2:	Mineralocorticoid receptor/Nuclear receptor subfamily 3 group C member 2
Oct4:	Octamer-binding transcription factor 4
Osmr:	Oncostatin M Receptor
Osr2:	Odd-skipped-related 2
P:	Jour post-natal
P24:	Dynactin light chain
P63:	Tumor protein P63
P73:	Tumor protein P73
Pax2/8 :	Paired box gene 2/8
Pde:	Phosphodiesterase
PDZ:	Domaine PDZ
PFA:	Paraformaldéhyde
Phlda2:	Pleckstrin homology like domain family A member 2
Pithx2:	Paired like homeodomain 2
Pkg:	Protein kinase G
Pla2g2a:	Phospholipase A2 group IIA
Plaur:	Urokinase plasminogen activator surface receptor
Plc:	Phospholipase C
Plekhs1:	Pleckstrin homology domain containing S1
Porcn:	Porcupine
Pp1a:	Serine/threonine-protein phosphatase 1
Pra/β:	Progesteron receptor α/β
Prdm1:	PR domain zinc finger protein 1

Prl8a2: Decidual prolactin-related protein
 Ptdgs: Producing lipocalin prostaglandin D synthase
 Ptgs2: Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
 Ptk7: Tyrosine-protein kinase-like 7
 RAC1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
 RCAN2: Calcipressin-2
 Retnlg: Resistin-like gamma precursor
 RHoA: Ras homolog family member A
 Rmrp: RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease
 Robo2: Roundabout guidance receptor 2
 ROCK: Rho-associated protein kinase
 Ror: RAR-related orphan receptor
 RPL19: Ribosomal protein L19
 Rspo1: R-Spondin 1
 RT-qPCR: Quantitative reverse transcription PCR
 Runx-1: Runt-related transcription factor 1
 Ryk: Receptor like tyrosine kinase
 SARAH: Sav/Rassf/Hpo domain
 Sav1: Salvador family WW domain containing protein 1
 Ser: Serine
 Serpinb7: Serine proteinase inhibitor, clade B, member 7
 Sfrp: Secreted frizzled-related protein
 ShRNA: Short hairpin RNA
 Slc14a1: Solute carrier family 14 member 1
 Slc2a3: Solute carrier family 2 member 3
 Smad: Mothers against decapentaplegic homolog
 Snai2: Snail family transcriptional repressor 2
 Sox2/9: SRY-Box 2/9
 SP-A: Surfactant protein A
 SPP1: Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)
 Stfa2: Stefin-2
 Sry: Sex-determining region on Y chromosome
 Synpo2: Synaptopodin 2
 Tac2: Tachykinin 2
 Tacr3: Tachykinin receptor 3
 Taz: Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
 TBX5: T-box transcription factor 5
 Tcf/Lef: Transcription factor/Lymphoid enhancer binding factor 1
 Tcf24: Transcription factor 24
 Tead1-4: TEA domain family members 1-4
 Tex15: Testis expressed 15
 Tgf- β : Transforming growth factor - β
 Tgfbr1/2: Transforming growth factor β receptor $\frac{1}{2}$
 Thr: Thréonine
 Tnfrsf12a: TNF receptor superfamily member 12A
 uPAR: Urokinase receptor

Vangl2: Vang-like protein 2
Vegf: Vascular endothelial growth factor
VPH/HPV: Virus du papillome humain/Human papilloma virus
Vsnl1 : Visinin-like protein 1
Wif: Wnt inhibitory factor
Wisp1: Wnt1 inducible signaling pathway protein 1
Wls: Wntless
Wnt: Wingless-type MMTV integration site family
Wt1: Wilms tumor 1
Wts: Serine/threonine protein kinase Warts
Yap: Yes-associated protein

REMERCIEMENTS

Derek et Marilène, pour leur support indéniable tout au long de mon PhD.

Tous les collègues du laboratoire Boerboom, de la FMV et du CDEVQ, pour l'entraide, le support et les nombreuses sorties bien méritées.

Les collaborateurs, sans qui ce travail n'aurait pu aboutir.

La superbe équipe du laboratoire d'histologie, pour leur aide grandement appréciée à l'égard de la quantité famineuse d'embryons coupés...

Ma famille et amis, qui ont toujours été à mes côtés et supporté mes décisions.

Kathy, qui m'endure encore et toujours malgré mes milliers de TOCs...

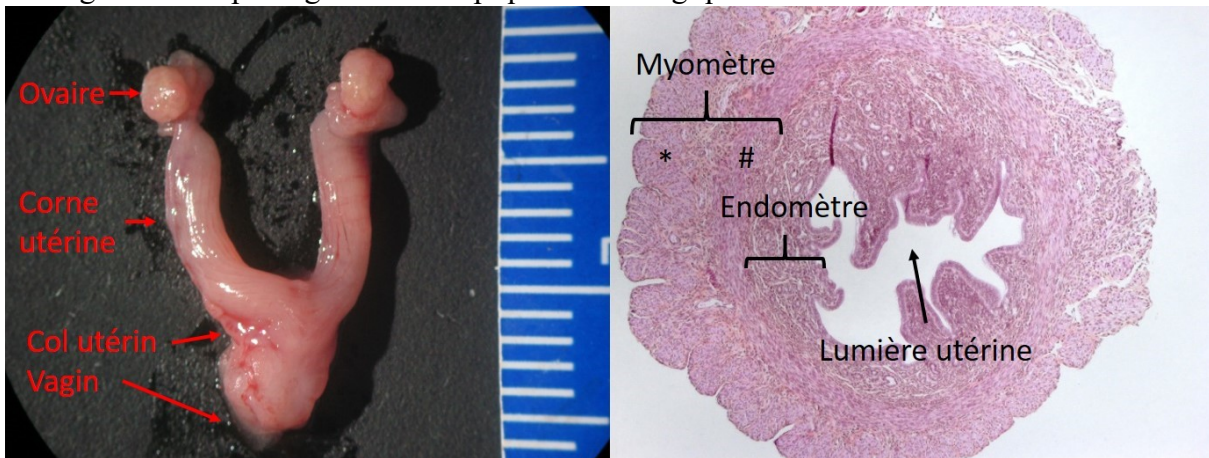
CHAPITRE 1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 ANATOMIE DE L'UTÉRUS

Le système reproducteur femelle murin est composé de deux ovaires, deux oviductes et de l'utérus (Figure 1). L'utérus est un organe tubulaire séparé en trois régions distinctes ; le col utérin, le corps utérin et les cornes utérines. La région crâniale de l'utérus correspond aux cornes utérines, site de la gestation. Ces dernières débutent près des pôles caudaux des reins, où sont situés les ovaires. L'oviducte fait office de communication entre la région périovarienne et les cornes utérines. Chaque corne utérine converge vers la région inguinale. Elles se rejoignent pour former le corps utérin, conférant à l'utérus une forme de «Y». La région caudale de l'utérus, le col, fait légèrement protrusion dans le vagin. On y retrouve le passage du canal cervical permettant la liaison entre le vagin et le corps utérin.

Le centre des cornes utérines et du corps utérin est constitué d'un espace vide (lumière utérine). Cette lumière est délimitée par une muqueuse interne, l'endomètre, surmonté de deux couches musculaires, le myomètre, et d'une couche externe, le périmètre. L'endomètre est tapissé d'un épithélium simple cubique. Cet épithélium s'invagine de façon variable dans le stroma sous-jacent pour former les glandes utérines. Le stroma endométrial est composé de cellules polygonales (cellules stromales) enchevêtrées de tissu conjonctif réticulaire lâche. Le myomètre est composé de deux couches de muscles lisses, une couche circulaire interne (#) et une couche longitudinale externe (*) (Figure 1). Ces deux couches musculaires sont séparées par une épaisse couche de tissu conjonctif vasculaire (Treuting, Dintzis, & Montine, 2018).

Figure 1. Morphologie macroscopique et histologique de l'utérus adulte chez la souris.



1.2 DÉVELOPPEMENT DE L'UTÉRUS

Initialement, le système reproducteur immature se présente sous la forme de paires de canaux embryonnaires. La première paire, les canaux de Wolff, est responsable de la formation des structures mâles alors que la seconde paire, les canaux de Müller, est responsable de la formation des structures femelles. Ces canaux se développent conjointement chez les deux sexes. Toutefois, ils dégèrent ou forment des structures reproductrices spécifiques selon le génotype sexuel et sous l'action de diverses substances/molécules (Figure 2). La chronologie des événements se déroulant chez la souris femelle est décrite dans les sections suivantes (Figure 3).

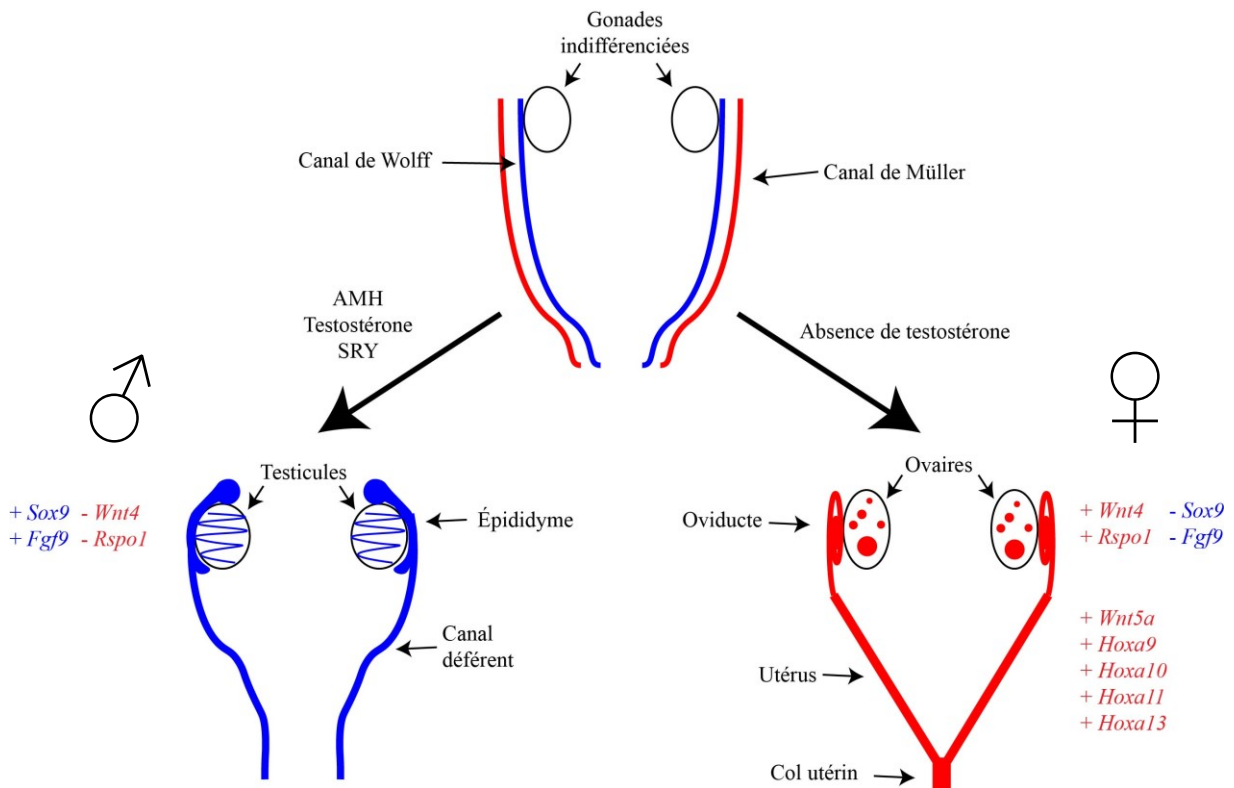


Figure 2. Signaux dictant le développement du tractus reproducteur.

(Inspirée de Kobayashi et al (2003))



Figure 3. Chronologie du développement du tractus reproducteur femelle chez la souris lors de l'embryogenèse

1.2.1 Formation du mésonéphros et des canaux de Wolff

Le mésonéphros correspond à une structure embryonnaire précurseur du système urogénital (Hoar, 1976). Il provient essentiellement de la portion intermédiaire du mésoderme embryonnaire, dont l'apparition est notable au jour E9. Le mésoderme prolifère pour former le pronéphros (crânial), le mésonéphros (moyen) et le métanéphros (caudal) (Staack, Donjacour, Brody, Cunha, & Carroll, 2003). Les canaux de Wolff sont issus du développement de canaux pronéphrétiques s'étendant jusqu'au cloaque au jour E9 (Hannema & Hughes, 2007). Ces derniers se forment suite à l'élongation de cordons cellulaires issus du mésoderme subissant une transition mésenchymateuse à épithéliale. Il en résulte une structure tubulaire composée d'un épithélium luminal délimité par un mésenchyme (Shaw & Renfree, 2014). Cette transition cellulaire est essentiellement régulée par les gènes *Pax2* et *Pax8* (Bouchard, Souabni, Mandler, Neubuser, & Busslinger, 2002; Torres, Gomez-Pardo, Dressler, & Gruss, 1995). Le pronéphros est un organe embryonnaire transitoire. Ce dernier régresse au jour E10, alors que les canaux pronéphrétiques persistent sous le nom de canaux mésonéphriques (ou canaux de Wolff) (Staack et al., 2003). La présence de ces canaux est essentielle, car ceux-ci participent à la formation des structures reproductrices mâles ainsi qu'à la formation du mésonéphros et des canaux de Müller chez la femelle (Hannema & Hughes, 2007; Kobayashi, Shawlot, Kania, & Behringer, 2004).

1.2.2 Développement des gonades primitives

Les crêtes urogénitales sont les structures précurseurs desquelles se développeront les gonades primitives (Y. Yang, Workman, & Wilson, 2018). Ces dernières sont issues de la prolifération localisée de l'épithélium cœlomique surmontant le mésoderme intermédiaire au

jour E9.5, sous l'influence du gène *Gata4* (Hu, Okumura, & Page, 2013). Les crêtes urogénitales sont initialement séparées en deux parties. L'une de ces parties participe à la formation des reins et du tractus urinaire. La seconde participe à la formation du primordium adrénogonadique, puisque les gonades et les surrénales ont une origine embryonnaire commune (Hatano, Takakusu, Nomura, & Morohashi, 1996). Il y a ainsi formation d'une structure épithéliale pseudostratifiée délimitée par une membrane basale. Cette membrane basale finit éventuellement par se dégénérer, permettant à davantage de cellules épithéliales de migrer, dont certaines y subiront une transition épithéliale à mésenchymateuse (Piprek, Kloc, & Kubiak, 2016). La migration continue et le primordium vient éventuellement à se séparer en deux structures distinctes, l'une étant la surrénale primitive et la seconde la gonade primitive. Cette séparation est évidente au jour E11 (Ikeda, Shen, Ingraham, & Parker, 1994). Durant cette période, des cellules germinales primordiales migrent de la base de l'allantoïde vers la gonade primordiale (Dolci, Campolo, & De Felici, 2015). Ces cellules se développent dans le tissu mésodermale extra-embryonnaire (ectoderme) au jour E6.5 sous l'influence de *Bmp4* (Lawson et al., 1999). Les mécanismes permettant à ces cellules d'acquies leur capacité migratoire demeurent méconnus (Richardson & Lehmann, 2010). Le trajet emprunté pour se rendre aux gonades est toutefois relativement bien décrit (Molyneaux, Stallock, Schaible, & Wylie, 2001). Le succès de cette étape dépend de l'expression de divers facteurs de transcription ainsi que de plusieurs molécules chémo-attractantes et d'adhésion (Richardson & Lehmann, 2010). La chémokine SDF1 est notamment exprimée par la crête urogénitale durant cette période. Son récepteur, CXCR4, est, pour sa part, exprimé par les cellules germinales primordiales en migration. Leur fonction complémentaire est essentielle pour le succès migratoire et la survie des cellules germinales primordiales (Molyneaux et al., 2003). Une fois installées dans la gonade, ces cellules subissent plusieurs étapes de division cellulaires ainsi que divers changements moléculaires les préparant pour la gamétogenèse (Y. Yang et al., 2018).

1.2.3 Formation des canaux de Müller

Les canaux de Müller se développent du côté dorsolatéral du mésonéphron, parallèlement aux canaux de Wolff déjà présents. Ce développement fait suite à trois étapes clés : la spécification, l'invagination et l'élongation (Figure 4) (Roly et al., 2018).

La spécification correspond à l'activation de cellules précurseurs situées dans une région prédéterminée de l'épithélium cœlomique au jour \approx E11.75 (Orvis & Behringer, 2007). L'activation de ces cellules est liée à l'expression autonome de la voie de signalisation BMP dans cette région clé de l'épithélium. Il en résulte une augmentation de l'activité de *Pax2*, un facteur de transcription régulant divers processus développementaux, et l'induction du gène *Lim1*, un marqueur important des cellules de Müller (Kobayashi et al., 2004; Torres et al., 1995).

Sous l'influence de divers signaux moléculaires, l'épithélium activé s'invagine dans le mésenchyme sous-jacent. L'expression de *Wnt4* dans le mésenchyme est essentielle afin d'initialiser le signal d'invagination (Kobayashi et al., 2004; Vainio, Heikkila, Kispert, Chin, & McMahon, 1999).

Suite à l'invagination, les cellules activées prolifèrent et migrent caudalement vers le sinus urogénital (Orvis & Behringer, 2007). Durant cette étape, les cellules Müllériennes sont étroitement liées au canal de Wolff adjacent car l'épithélium de ce dernier sécrète certains signaux attractants, dont *Wnt9b*, essentiels pour l'orientation directionnelle adéquate du processus de migration (Carroll, Park, Hayashi, Majumdar, & McMahon, 2005; Fujino et al., 2009). L'expression de *Wnt4* dans le mésenchyme contribue aussi à la coordination du processus de migration (Prunskaitė-Hyyryläinen et al., 2016). Une fois sa destination atteinte, le canal de Müller fusionne au sinus urogénital (Roly et al., 2018).

Le processus de formation des canaux de Müller est complété au jour E13.5 (Orvis & Behringer, 2007). À ce moment, les canaux sont composés d'une couche épithéliale externe (épithélium de surface Müllérien), d'un mésenchyme (mésenchyme de Müller) et d'une couche épithéliale luminale (épithélium de Müller) (Roly et al., 2018). Les canaux de Wolff et de Müller cohabitent jusqu'au moment de la différenciation sexuelle (Figure 5).

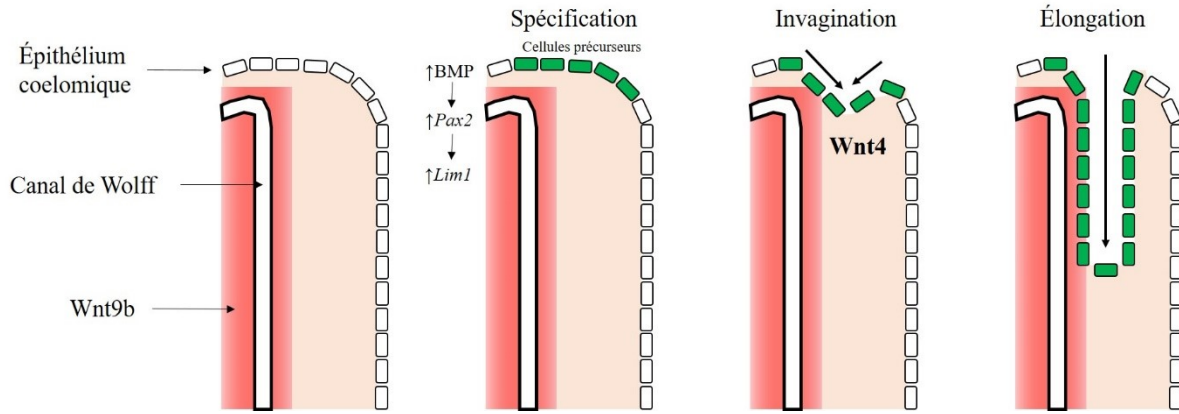


Figure 4. Étapes du développement des canaux de Müller

Inspirée de Rory et al (2018)

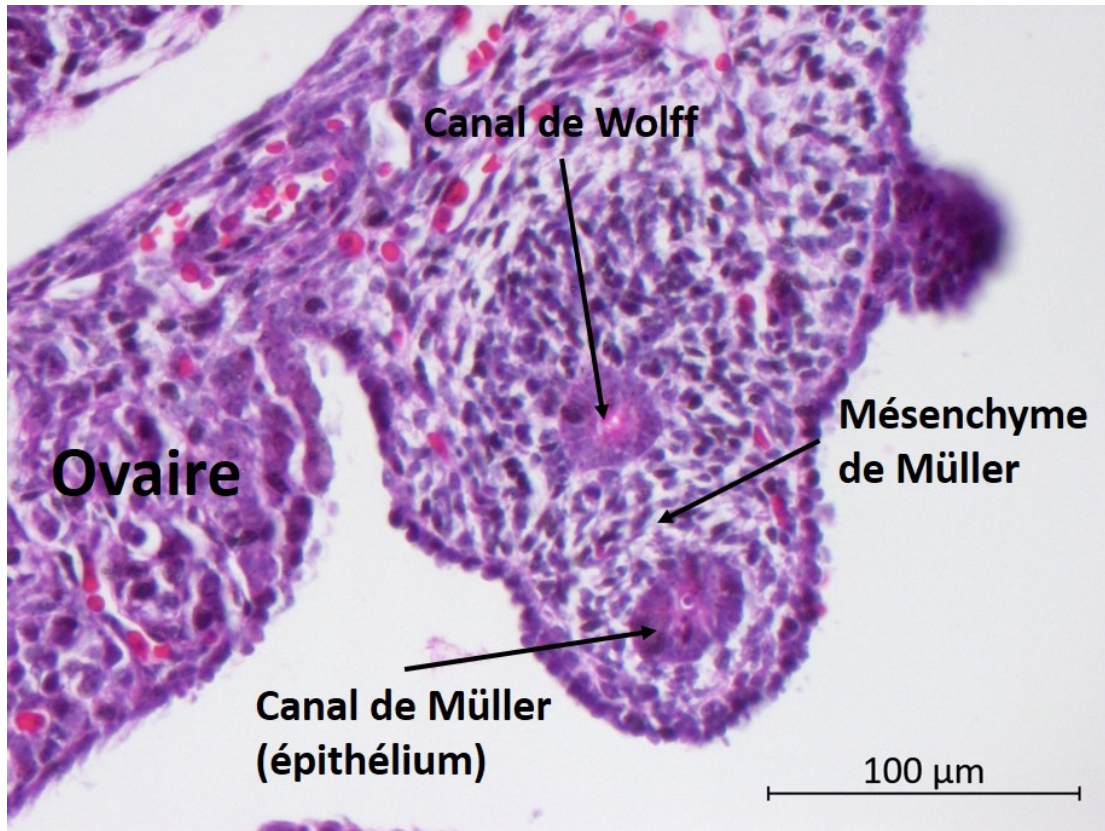


Figure 5. Morphologie histologique des canaux de Müller (E14.5)

1.2.4 Différenciation sexuelle

Chez les mammifères, la détermination sexuelle est associée à un système biologique d'origine génétique, avec implication de divers gènes ou allèles codant pour des traits sexuels spécifiques. Cette différenciation est associée à un gène principal («sex locus») entraînant l'expression de nombreux autres gènes secondaires. Chez la souris (tout comme chez l'humain), ce système est principalement exprimé par la combinaison des chromosomes sexuels X et Y, où le chromosome Y est responsable des traits masculins. Une combinaison double du chromosome X est donc responsable de la détermination femelle (Erickson, Durbin, & Tres, 1987; SF, 2000). La présence d'une région déterminante du sexe (sur le chromosome Y (Sry)) fait maintenant partie intégrante du consensus scientifique lié à la détermination du sexe (Sinclair et al., 1990). De façon sommaire, l'expression de Sry chez le mâle favorise l'expression de *Sox9* qui, à son tour, stimule l'expression de *Fgf9*. Ces derniers travaillent conjointement dans le but de limiter l'effet de *Wnt4* et ainsi favoriser le phénotype testiculaire. Chez la femelle, l'absence complète d'expression de Sry favorise l'activité de *Wnt4* et *Rspo1*, stabilisant ainsi la β -catenin et favorisant un phénotype ovarien (Eggers & Sinclair, 2012).

L'expression de *Wnt4*, inhibant l'expression de *Sox9* et *Fgf9*, supprime le développement des cellules de Leydig et laisse ainsi le champ libre au développement des ovaires (Bernard & Harley, 2007; Vainio et al., 1999). *Wnt4* augmente l'expression de différents gènes dont *Notum*, *Phlda2*, *Runx-1* et *Msx1* chez la femelle, mais aussi *Osr2*, *Dach2*, *Pithx2* et *Tacr3* chez le mâle. L'un de ces gènes, *Runx-1*, est très important car il participe activement à la formation du complexe aorte-gonade-mésonephron (Naillat et al., 2015). L'expression de *Wnt4* persiste après la différenciation en gonades femelles, mais régresse dans le cas des mâles (Bernard & Harley, 2007).

À titre d'exemple, l'inactivation totale de *Wnt4* (souris *Wnt4* $-/-$) entraîne la masculinisation des gonades et du système reproducteur femelle avec persistance des canaux de Wolff ainsi qu'une diminution importante du nombre de cellules germinales dans les gonades d'embryons entre E10,5 et E12,5 (Vainio et al., 1999). L'absence de *Wnt4* résulte aussi en l'expression ectopique de *3 β -HSD* dans l'ovaire, une enzyme stéroïdogène nécessaire à la synthèse de testostérone. Il en résulte une augmentation de la testostérone sérique chez des souris femelles «null», avec notamment la masculinisation de ces dernières (Bernard & Harley, 2007). Chez des souris femelles mutantes, une inactivation simultanée de *Wnt4* et de *Foxl2* a

mené au développement de structures tubulaires mâles dans leurs ovaires qui comprenaient à la fois des cellules germinales mâles et femelles. Ces structures exprimaient fortement les protéines mâles SOX9 et AMH et, à un moindre degré, DMRT1, DMRT3, PTDGS et GDNF (Ottolenghi et al., 2007).

1.2.5 Régression des canaux de Wolff

Chez le mâle, la testostérone produite par les cellules de Leydig suite à la différenciation sexuelle est essentielle pour le développement et la différenciation des canaux de Wolff (Shaw & Renfree, 2014). Chez la femelle, l'absence de testostérone combinée à l'absence d'hormone anti-müllérienne entraînent la régression des canaux de Wolff et la différenciation des canaux de Müller en structures reproductrices femelles (Roly et al., 2018). La régression des canaux de Wolff débute dès le jour E13 et se termine environ à E16 chez la femelle. Cette régression a essentiellement lieu grâce à l'autophagie, l'hétérophagie, l'apoptose cellulaire et l'inhibition de la prolifération cellulaire (principalement épithéliale) des différentes composantes des canaux (Dyche, 1979; Welsh, Sharpe, Walker, Smith, & Saunders, 2009). Les mécanismes associés à la régression des canaux de Wolff demeurent encore méconnus. L'absence de stimulation locale par la testostérone semble suffisante, à elle seule, pour induire la régression de ces derniers (Goodman, 2009; Yeh et al., 2002). Une étude récente semble démontrer que cette régression est, en partie, promue par le récepteur nucléaire COUP-TFII. Ce dernier inhiberait l'expression des facteurs de croissance *Fgf7* et *Fgf10*. Il en résulterait ainsi une diminution des interactions mésenchymateuses-épithéliales. Cette étude suggère donc que la persistance des canaux de Wolff chez le mâle serait due à un possible effet inhibiteur de la testostérone sur COUP-TFII (F. Zhao et al., 2017). Une fois la régression entamée, il a été démontré que le gène *Msx2* régule l'apoptose dans l'épithélium luminal (Yin, Lin, & Ma, 2006).

1.2.6 Différenciation des canaux de Müller

À la naissance, l'utérus est dans un état d'immaturation notable et est essentiellement composé d'un épithélium luminal et d'un mésenchyme indifférencié (Cooke, Spencer, Bartol, & Hayashi, 2013).

La séparation des différentes couches débute très tôt suite à la naissance et se fait selon un patron à la fois antéropostérieur et radial (Spencer, Dunlap, & Filant, 2012). La structuration antéropostérieure correspond à l'établissement des limites structurales selon un axe longitudinal. Il permet ainsi de discerner les oviductes de l'utérus et du vagin (Spencer et al., 2012). Les principaux régulateurs de cette structuration sont issus des facteurs de transcription de la famille de gènes *Hoxa*. Ces derniers participent au développement embryonnaire selon un axe crânio-caudal, dont chaque région de cet axe est régulée par un *Hoxa* spécifique (Mallo & Alonso, 2013). Chez la souris, *Hoxa9* est exprimé dans l'oviducte, *Hoxa10* et *Hoxa11* sont exprimés dans l'utérus et *Hoxa13* dans le vagin (Taylor, Vanden Heuvel, & Igarashi, 1997). La dérégulation de ces *Hoxa* entraîne notamment de nombreuses anomalies structurales du système reproducteur femelle (Benson et al., 1996; Gendron et al., 1997; Warot, Fromental-Ramain, Fraulob, Chambon, & Dolle, 1997; Y. Zhao & Potter, 2001).

La structuration radiale correspond à l'établissement des différentes couches utérines selon un axe transverse (Spencer et al., 2012). Dès le troisième jour d'âge (P3), le mésenchyme commence à se séparer en trois différentes couches reconnaissables par l'orientation des noyaux. Au jour P5, la séparation est évidente et l'on commence à observer la différenciation des cellules musculaires lisses dans la couche circulaire du myomètre en formation ainsi que l'apparition de la couche vasculaire située entre les deux couches myométriales. Au jour P10, la différenciation des cellules musculaires lisses débute dans la couche longitudinale (Brody & Cunha, 1989).

Une grande proportion du processus d'orientation et de différenciation du myomètre semble régulée par la voie TGF- β . L'analyse d'un modèle de souris avec une invalidation conditionnelle du récepteur *TGF β RI* dans le mésenchyme de Müller a démontré des anomalies notables dans le myomètre débutant dès les premiers jours suivant la naissance. Ces changements ne semblent pas directement associés à une altération de la différenciation cellulaire (muscles lisses), mais plutôt à une désorganisation de cette différenciation et une altération de la migration des cellules mésenchymateuses lors de la ségrégation des différentes

couches myométriales (Y. Gao, Bayless, & Li, 2014). L'œstrogène aussi semble être impliqué dans le processus de différenciation myométriale (Mehasseb, Bell, & Habiba, 2009).

Le développement des glandes endométriales débute par le bourgeonnement de l'épithélium luminal dans le mésenchyme. Ce processus débute dès le jour P5. Toutefois, les glandes ne sont habituellement pas distinguables avant P7 et leur développement se termine à P10 (Brody & Cunha, 1989; Cooke et al., 2013). Les glandes utérines sont essentielles au bon fonctionnement de l'utérus, car leur présence est requise pour la gestation (notamment par l'expression de gènes essentiels à cet effet, tel *Lif*). Leur développement nécessite l'implication de plusieurs gènes, dont certains *Wnts*, *HOXs*, *Lef1*, *Foxa2*, *Vangl2*, *Cdh1*, etc. (Cooke et al., 2013; Filant & Spencer, 2013; Hayashi et al., 2011). Le gène *Lif*, par exemple, s'exprime exclusivement dans les glandes endométriales lors de la phase préparatoire de l'utérus, puis dans le stroma environnant de l'embryon implanté (Salleh & Giribabu, 2014). Il participe à plusieurs étapes importantes de la gestation, dont les interactions embryo-endométriales, la décidualisation, l'invasion trophoblastique, le développement du blastocyte et l'infiltration leucocytaire utérine (Filant & Spencer, 2013). Le développement des glandes peut être en partie arrêté à l'aide de progestérone (inhibition de la prolifération épithéliale) (Cooke et al., 2012; Cooke et al., 2013).

L'utérus atteint une apparence mature, similaire à l'adulte, au jour P15 (Brody & Cunha, 1989).

1.3 RÉGULATION HORMONALE DU CYCLE OESTRAL

L'utérus est un organe dynamique et cyclique contrôlé par une chorégraphie hormonale méticuleusement orchestrée par l'ovaire. Une dérégulation parfois minime de ce cycle hormonal peut entraîner des changements biologiques pouvant mener à l'infertilité.

Le cycle reproducteur normal est un processus complexe regroupant différentes interactions endocriniennes appartenant à l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadal. En résumé, la relâche de GnRH par l'hypothalamus stimule la sécrétion de FSH et LH par les cellules de la partie antérieure de l'hypophyse. Il en résulte une augmentation de la production d'œstrogène et de progestérone par l'ovaire ainsi que la croissance et la survie de l'ovocyte avant ovulation (Mosavat, Mohamed, & Mirsanjari, 2013). La présence de récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone dans les cellules hypothalamiques et pituitaires impliquées ainsi que des boucles d'autorégulation géniques (LH, FSH, GnRH) assurent les capacités de rétrocontrôle de cet axe (Abedini et al., 2016; Bashour & Wray, 2012; Gieske et al., 2008; Roy, Angelini, & Belsham, 1999).

Chez la souris, chaque cycle œstral dure en moyenne 4 à 5 jours (Cora, Kooistra, & Travlos, 2015) et est divisé en quatre phases pouvant durer chacun entre 6h et 72h selon les situations : proestrus (\approx 24h), oestrus (\approx 12h-48h), metoestrus (\approx 24h), dioestrus (\approx 48h-72h) (Cora et al., 2015). Durant le cycle, la morphologie utérine et vaginale subit des modifications sous l'influence de l'œstrogène et de la progestérone en circulation (Treuting et al., 2018).

L'œstrogène se lie à des récepteurs spécifiques, ER α et ER β , qui sont retrouvés dans le stroma et l'épithélium de l'utérus en développement (ER α et ER β) ainsi que tous les compartiments de l'utérus mature (ER α) (Medina, Strasser, & Kincade, 2000; H. Wang, Eriksson, & Sahlin, 2000). Il participe principalement à la prolifération de l'épithélium luminal et glandulaire (O'Brien et al., 2006). L'effet de l'œstrogène peut agir via deux mécanismes distincts. Le premier est caractérisé par la liaison directe du complexe œstrogène-ER à une séquence spécifique d'ADN (élément de réponse à l'œstrogène ou ERE (ex : GGTCAnnnTGACC)) notée dans les gènes cibles. Le complexe peut interagir avec des coactivateurs transcriptionnels afin d'augmenter l'efficacité de cette transcription. Le second est caractérisé par la liaison du complexe avec un facteur de transcription afin de le stabiliser ou de contribuer au recrutement des coactivateurs (Klinge, 2001).

La progestérone exerce, via ses récepteurs PR α et PR β , des rôles essentiels pour la fonction reproductrice tels l'implantation, la décidualisation et le maintien de la gestation (Graham & Clarke, 1997). Dans l'utérus, les récepteurs sont majoritairement exprimés dans le stroma endométrial, le myomètre et, à un moindre degré, dans l'épithélium luminal (Graham & Clarke, 1997; Tibbetts, Mendoza-Meneses, O'Malley, & Conneely, 1998). Elle exerce des rôles majoritairement antagonistes à l'œstrogène et favorise principalement la prolifération du stroma endométrial et la diminution de l'inflammation utérine (Tibbetts et al., 1998)

1.4 PHYSIOLOGIE DE L'UTÉRUS

L'utérus participe à cinq processus essentiels pour le succès de la reproduction et la gestation ; la fécondation, la nidation, la décidualisation, la placentation et les échanges fœto-maternels ainsi que la parturition. Suite à la parturition, l'utérus subira une involution physiologique afin de se préparer pour une gestation ultérieure.

1.4.1 Fécondation

La rencontre entre le spermatozoïde et l'ovocyte a lieu dans l'oviducte. Les spermatozoïdes doivent se déplacer à travers le tractus reproducteur femelle jusqu'au lieu de fécondation. L'utérus participe à ce processus de transport et de fécondation grâce à différents procédés mécaniques, immunologiques et moléculaires. Les spermatozoïdes ayant des défauts intrinsèques de transport et de mobilité sont éliminés (Barros, Vigil, Herrera, Arguello, & Walker, 1984). Chez la souris, le passage à travers le col et l'utérus est rapide et le sperme peut atteindre l'oviducte en moins de 30 minutes (Plant et al., 2015). Chez la femme, il est rapporté que des contractions myométriales, encore une fois sous l'influence hormonale, permettraient d'accélérer le transport des spermatozoïdes jusqu'au site de fécondation (Kunz, Beil, Deininger, Wildt, & Leyendecker, 1996; Lyons et al., 1991; Plant et al., 2015). Ces contractions, ici caractéristiquement rétrogrades (col vers utérus) plutôt qu'expulsantes, ont lieu durant la phase folliculaire ovarienne (de Ziegler, Bulletti, Fanchin, Epiney, & Brioschi, 2001). Bien que l'utérus murin semble capable de telles contractions, ce phénomène ne semble pas participer étroitement au transport du sperme à travers le tractus reproducteur (Gravina, van Helden, Kerr, de Oliveira, & Jobling, 2014).

L'utérus contribue à la fécondation en formant un environnement immunologique actif pour la sélection des spermatozoïdes, favorisant la capacitation des spermatozoïdes via la présence d'ions bicarbonates (HCO_3^-) et la régulation du calcium et facilitant les échanges avec les spermatozoïdes via des vésicules extracellulaires (utérosomes), etc. (H. C. Chan et al., 2006; H. C. Chan & Sun, 2014; Jin & Yang, 2016; Kutteh, Prince, Hammond, Kutteh, & Mestecky, 1996; Y. Liu, Wang, & Chen, 2012; Martin-DeLeon, 2016; Pacey & Suarez, 2005; Pandya & Cohen, 1985; Schubert et al., 2008).

1.4.2 Nidation

La nidation est le processus durant lequel le blastocyste, alors libre dans la lumière utérine, acquiert la capacité de s'attacher à l'utérus afin de s'y implanter et croître (Plant et al., 2015). Trois étapes clés sont essentielles pour une nidation adéquate ; l'apposition, l'adhésion et l'invasion. La réceptivité de l'utérus à l'égard des signaux d'apposition du blastocyste se produit durant une période de temps limitée (Paria, Huet-Hudson, & Dey, 1993; Plant et al., 2015). Cette fenêtre de nidation est régulée en grande partie par une coordination minutieuse des hormones stéroïdiennes d'origine ovarienne.

L'œstradiol d'origine ovarienne stimule la prolifération de l'épithélium de surface alors que la progestérone stimule la prolifération du stroma utérin (Matsumoto, 2017). L'étendue de la période de nidation est grandement influencée par les niveaux de ces hormones (Matsumoto, 2017; Namiki, Ito, & Kashiwazaki, 2018). Il a d'ailleurs été démontré que la période de réceptivité était accrue lorsque l'œstrogène est maintenue à des niveaux bas (Ma, Song, Das, Paria, & Dey, 2003). Au contraire, une stimulation accrue d'œstrogène durant cette période peut entraîner des changements morphologiques et moléculaires excessifs induisant une période réfractaire sans évidence de période de réceptivité (Paria et al., 1993). Dans le cas de la progestérone, des niveaux élevés doivent être maintenus tout au long de cette période (Namiki et al., 2018).

La nidation du blastocyste a lieu dans des cryptes (ou chambres de nidation) formées par l'invagination de l'épithélium luminal et situées dans l'axe longitudinal de l'utérus, du côté antémésométrial. La formation de ces cryptes dépend en grande partie de signaux régulant la polarité planaire des cellules épithéliales (Yuan et al., 2016). Les interactions membranaires ayant lieu entre le blastocyste et l'utérus entraînent des changements affectant une grande variété

de molécules, incluant des intégrines, des molécules de la matrice extracellulaire, des molécules adhésives, des facteurs de croissance et des protéases. Les variations parmi ces molécules sont essentielles pour les étapes d'adhésion et de pénétration du blastocyste (Davidson & Coward, 2016; B. He, Ni, Kong, Lu, & Wang, 2018; Matsumoto, 2017; Namiki et al., 2018).

1.4.3 Décidualisation

La décidualisation est un processus durant lequel les cellules stromales endométriales subissent des changements morphologiques et physiologiques afin d'accueillir l'embryon en nidation.

Le processus de décidualisation débute dans la région immédiate des cryptes endométriales au moment où le blastocyste entre en contact avec l'épithélium de surface. Suite à la perte de l'épithélium de surface, la réaction déciduale s'étend de façon antimésométriale jusqu'à la limite du myomètre, et éventuellement du côté mésométrial (Abrahamsohn & Zorn, 1993). Elle est caractérisée initialement par une phase de prolifération stromale à la périphérie du blastocyste. Suite à l'apposition du blastocyste et la dégradation de l'épithélium de surface au site de nidation, le stroma endométrial cesse de proliférer et les cellules stromales se différencient en cellules déciduales (Tan et al., 2002). La région antimésométriale, la première à subir ces changements, est ainsi appelée décidua primaire. Elle apparaît au 5^e jour de gestation (E5), est peu vascularisée et composée essentiellement de cellules déciduales matures polyédrales, au noyau euchromatique, au nucléole proéminent, au cytoplasme parfois vacuolaire et contenant de nombreux filaments intermédiaires (Abrahamsohn & Zorn, 1993). La décidua primaire diminue fortement de taille suite à l'apoptose de la majorité de ces cellules. La région adjacente à la décidua primaire apoptotique continue toutefois de proliférer et de se différencier pour former la décidua secondaire environ au 7^e - 8^e jour de gestation (E7-8) (Tan et al., 2002). La réaction déciduale ayant lieu au pôle mésométrial est moins marquée et caractérisée par une prolifération et différenciation en cellules habituellement non-polyploïdes (Sroga, Ma, & Das, 2012).

Le processus de décidualisation est essentiellement médié par la progestérone (Paria, Tan, Lubahn, Dey, & Das, 1999). Toutefois, la majorité des modèles attribue aussi un rôle subsidiaire à l'œstrogène dans la phase initiale du processus, soit en augmentant la réceptivité

des cellules à la progestérone (Ramathal, Bagchi, Taylor, & Bagchi, 2010; Sandra, 2016). L'œstrogène contribuerait notamment à augmenter le nombre de récepteurs à la progestérone dans le stroma tout en diminuant le nombre de récepteurs dans l'épithélium utérin (Takeshi Kurita et al., 2000; T. Kurita et al., 2001; Tibbetts et al., 1998). Toutefois, la possibilité d'induire la décidualisation en absence d'œstrogène ainsi qu'en présence d'une faible quantité de récepteurs à l'œstrogène dans les cellules déciduales suggèrent que cet effet serait possiblement limité durant un court moment précédant la différenciation des cellules stromales (Paria et al., 1999). Un équilibre fin entre les concentrations de ces deux hormones est encore nécessaire car des concentrations insuffisantes ou en excès à des moments clés peuvent être délétères pour la réaction déciduale (Liang et al., 2018; Lydon et al., 1995; Pawar, Laws, Bagchi, & Bagchi, 2015). L'effet de l'œstrogène et de la progestérone se fait via leurs récepteurs respectifs (ER α , ER β , PR α , PR β), entraînant une cascade de médiateurs moléculaires requis pour la décidualisation, dont des facteurs de transcription de la famille des *Hoxa* et C/EBP β , des molécules de la voie TGF- β , Wnt et Indian Hedgehog, des récepteurs nucléaires orphelins (COUP-TFII), des composantes angiogéniques et de jonction (Connexin-43), etc. (N. Ni & Li, 2017; Ramathal et al., 2010).

Le développement conjoint de la réaction déciduale durant la nidation de l'embryon est essentiel, car les cellules déciduales nouvellement formées contiennent une multitude de facteurs pro-invasifs (tels que des interleukines) qui sont importants pour l'invasion du trophoblaste durant l'étape finale de la nidation. La régulation spatiotemporelle de cette étape est étroitement contrôlée afin de permettre la formation du placenta (S. Sharma, Godbole, & Modi, 2016).

1.4.4 Placentation

Le placenta est un organe dynamique et transitoire servant de liaison entre le fœtus et la mère. Il a pour rôle de contrôler les échanges gazeux et nutritionnels ainsi que permettre l'excrétion des déchets métaboliques chez le fœtus, processus essentiels pour sa survie lors de la gestation (Ji et al., 2013). La souris et l'humain ont un placenta hémochorial, c'est-à-dire dont le trophoblaste est directement exposé au sang maternel. De ce fait, la souris constitue un modèle comparé intéressant pour l'étude du développement et de la fonction du placenta (Woods, Perez-Garcia, & Hemberger, 2018). Une des caractéristiques unique de cet organe découle du fait qu'il

est composé à la fois de tissus d'origines foetal et maternel (Treuting et al., 2018). Il est composé de 6 couches cellulaires distinctes, dont 5 appartiennent à l'embryon (Figure 6).

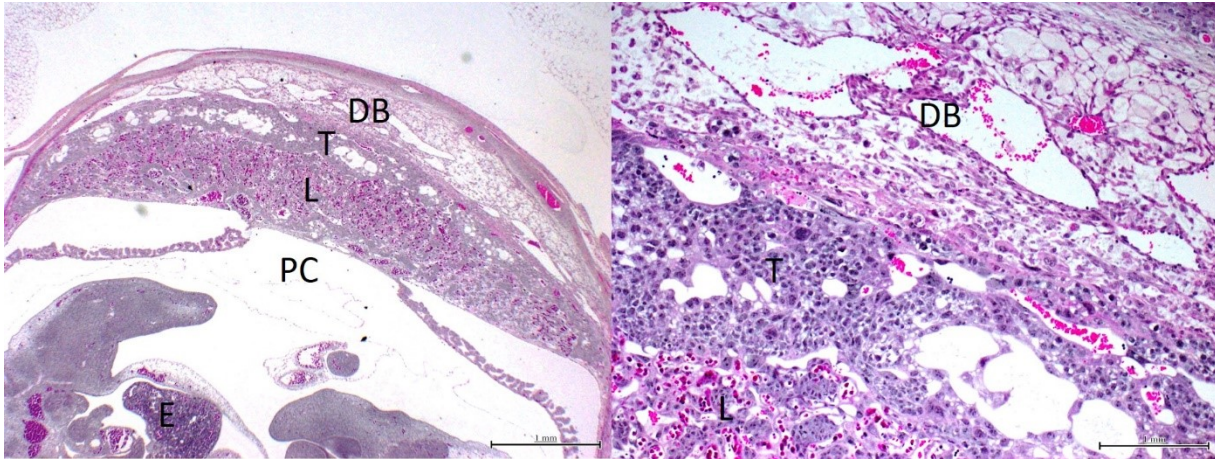


Figure 6. Morphologie placentaire.

PC=Plaque chorioallantoïque, L=Labyrinthe, T=Zone jonctionnelle (incluant les spongiotrophoblastes et cellules géantes), DB=Décidua basale, E=embryon

Le sang maternel arrive au placenta par les artères spiralées et quitte par les veines utérines, alors que le sang foetal arrive au placenta par l'artère ombilicale, puis se divise entre les capillaires des villosités du chorion avant de quitter par la veine ombilicale (Treuting et al., 2018). Des érythrocytes nucléés d'origine embryonnaire sont observés dans la lumière des vaisseaux du labyrinthe alors que des érythrocytes matures d'origine maternelle sont observés dans les espaces entre les cellules trophoblastiques, démontrant l'étroit contact sanguin entre les parties impliquées (Treuting et al., 2018). Une zone de jonction est établie entre la décidua maternelle et le labyrinthe. Cette zone est composée de cellules spongiotrophoblastiques, de cellules glycogéniques ainsi que de cellules géantes trophoblastiques et exerce une fonction endocrine essentielle pour la gestation (Woods et al., 2018).

1.4.5 Gestation et parturition

Lors de la gestation, l'utérus gravide doit s'adapter à la croissance rapide du foetus et subir diverses adaptations morphologiques afin d'augmenter sa capacité de support. Ces changements sont habituellement caractérisés par une hyperplasie et une hypertrophie des

cellules musculaires lisses du myomètre accompagnées d'une augmentation de la synthèse de collagène dans le stroma endométrial (Kyathanahalli et al., 2013). L'hyperplasie survient tôt durant la gestation et est en partie régulée par l'œstrogène (Jaffer, Shynlova, & Lye, 2009). La phase de prolifération du myomètre a lieu principalement durant la première moitié de la gestation. La prolifération laisse graduellement place à l'hypertrophie des cellules musculaires lisses dans la seconde moitié de la gestation suite à l'effet mécanique causé par la croissance fœtale (Hsu et al., 2014; O. Shynlova, Kwong, & Lye, 2010).

Le dépôt de matrice extracellulaire (collagène) dans la paroi utérine augmente de façon proportionnelle à la taille de l'utérus (Harkness & Harkness, 1954). Le dépôt de collagène fibrillaire (I et III) dans le myomètre est nécessaire au support et au maintien de la force mécanique des fibres musculaires en hypertrophie (Leppert, Jayes, & Segars, 2014; Oksana Shynlova, Mitchell, Tsampalieros, Langille, & Lye, 2004). Le dépôt de molécules d'adhésion (Collagène IV, fibronectine, laminine $\beta 2$) dans le myomètre vers la fin de la gestation permet d'augmenter l'élasticité de l'utérus pour le préparer à la parturition (Nishinaka & Fukuda, 1991; Oksana Shynlova et al., 2004).

Chez la souris, la sécrétion de protéines du surfactant par les poumons du fœtus initialise la parturition (Condon, Jeyasuria, Faust, & Mendelson, 2004; L. Gao et al., 2015). La présence de protéines du surfactant témoigne de la maturité pulmonaire et, donc, de la maturité fœtale (Mendelson & Boggaram, 1991).

L'augmentation des cytokines inflammatoires dans le liquide amniotique et l'activation de NF- $\kappa\beta$ dans l'utérus stimulé par les protéines de surfactant agissent sur différents fronts et résultent en une diminution drastique de la concentration de progestérone et de l'activité de récepteurs à la progestérone. De nombreux facteurs stimulant ou régulant la contraction utérine, dont la COX-1, la COX-2, le récepteur à l'ocytocine, les prostaglandines et leurs récepteurs sont subséquentement augmentés (Fuchs, Fuchs, Husslein, & Soloff, 1984; Herington et al., 2018; Imamura, Luedke, Vogt, & Muglia, 2000; Olson, 2003; Quinones-Jenab et al., 1997; Soloff, Cook, Jeng, & Anderson, 2004).

L'équilibre qui s'établit parmi ces différents signaux hormonaux et inflammatoires favorise l'activité contractile de l'utérus et la relaxation du col utérin et du vagin, résultant en l'expulsion du fœtus (Figure 7) (Plant et al., 2015).

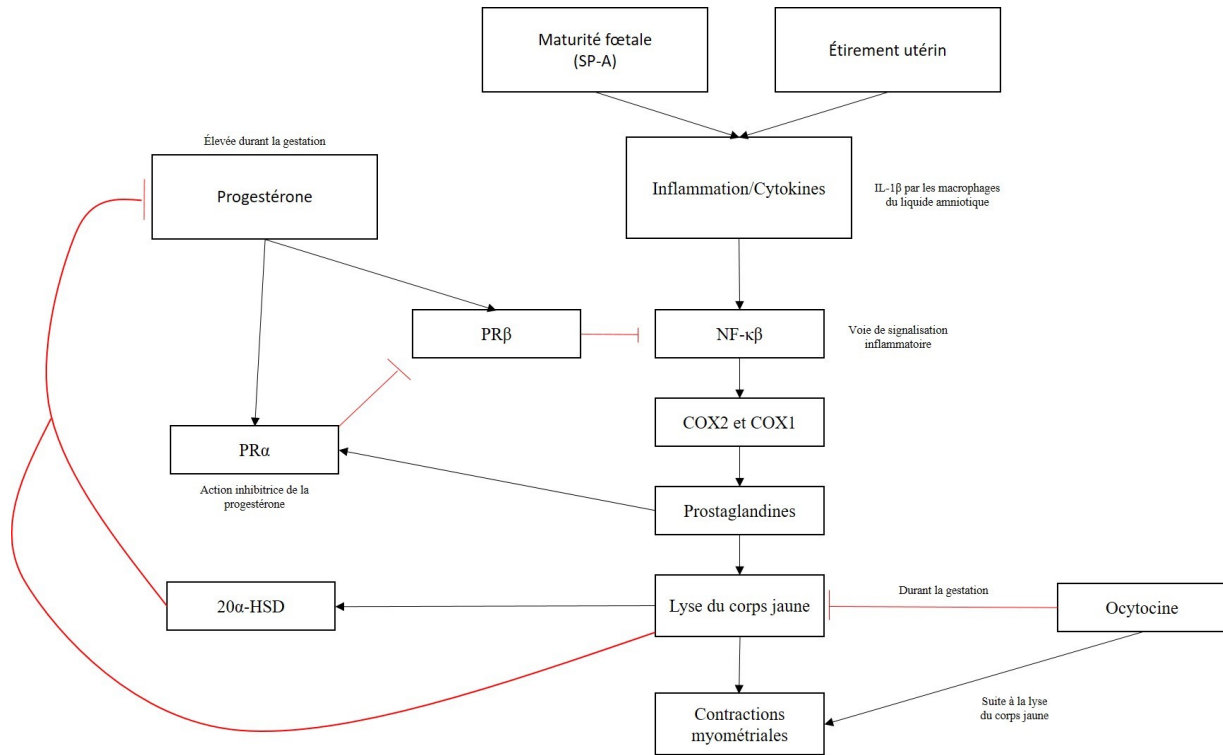


Figure 7. Résumé des signaux contrôlant la parturition chez la souris

Suite à la parturition, l'utérus reprend sa taille et sa fonction normale par un processus physiologique appelé involution utérine afin d'être prêt pour une gestation subséquente. Cette diminution rapide de taille est régulée par diverses actions physiologiques, dont l'atrophie, l'apoptose, la phagocytose, l'autophagie et la dégradation des fibres musculaires et du collagène en excédent. Une grande proportion des fibres musculaires s'atrophie à l'aide de l'autophagie, menant à l'emmagasinement de composantes en excès dans des autophagosomes, dégradées suite à la fusion des autophagosomes avec des lysosomes (Hsu et al., 2014). Plusieurs signaux anti-apoptotiques actifs durant la gestation (dont *Mcl1*) sont désactivés suite à la parturition, entraînant une cascade menant à l'activation de la caspase-3 et l'apoptose cellulaire dans l'utérus en involution (Jeyasuria, Subedi, Suresh, & Condon, 2011; Kyathanahalli et al., 2013). L'activité des cellules phagocytaires (macrophages et neutrophiles) est aussi accrue (Ryon, Bendickson, & Nilsen-Hamilton, 2002; Shkurupiy, Obedinskaya, & Nadeev, 2011). Le collagène en excès dans le myomètre est dégradé à l'aide d'enzymes collagénolytiques de la famille des métalloprotéases matricielles (MMPs) (Balbin et al., 1998; Manase et al., 2006).

1.5 VOIE WNT

1.5.1 Introduction

Les molécules WNTs sont une grande famille de glycoprotéines de signalisation ayant un rôle prépondérant dans la régulation de processus variés présents lors de l'embryogenèse (Clevers, 2006; Karner, Wharton, & Carroll, 2006; Y. Pei et al., 2012). Ces rôles incluent la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, la motilité et l'apoptose (Bodine, 2008; De Boer, Wang, & Van Blitterswijk, 2004; Endo et al., 2005; Kahlert et al., 2012; Masckauchan, Shawber, Funahashi, Li, & Kitajewski, 2005; Pećina-Slaus, 2010; Y. Pei et al., 2012; Teo & Kahn, 2010). Bien qu'on lui attribue principalement un rôle embryogénique, il est à noter que ses implications à l'âge adulte sont maintenant amplement reconnues et multisystémiques. Les systèmes touchés incluent le système nerveux, le système cardiovasculaire, le système gastro-intestinal, le système myoarthrosquelettique, le système hématopoïétique et le système reproducteur (Abedini, Zamberlam, Boerboom, & Price, 2015; Abedini et al., 2016; Bitler et al., 2011; Boyer et al., 2010; H. Chen & Cheng, 2016; Q. Chen et al., 2009; C. W. Cheng, Smith, & Charnock-Jones, 2008; Duan & Bonewald, 2016; Fan et al., 2012; Gaetje et al., 2007; Hayashi et al., 2009; Hernandez Gifford, 2015; Malekar et al., 2010; Mohamed et al., 2005; Ozhan & Weidinger, 2015; Rudolf et al., 2016; Schafer et al., 2015; Sonderegger, Pollheimer, & Knofler, 2010; Staal, Chhatta, & Mikkers, 2016; Varela-Nallar & Inestrosa, 2013; Q. Wang et al., 2013; Yoshioka et al., 2012). La voie Wnt joue des rôles essentiels non seulement dans la formation, mais aussi dans la différenciation des canaux de Müller et la fonction de l'utérus. Ces rôles sont abordés plus en détail dans cette section.

1.5.2 Découverte de la voie Wnt

L'origine des WNTs découle indirectement d'une description datant de 1936 dans laquelle des généticiens ont décrit des mouches drosophiles mutantes ayant les yeux vitreux (Morgan, Bridges, Schultz, & Schultz, 1936). Près de 40 ans plus tard, des chercheurs ont décrit, dans un autre contexte, des mouches drosophiles mutantes dénudées d'ailes. Le gène affecté dans cette condition a été appelé *wingless* (R. P. Sharma & Chopra, 1976). En 1987, il a été découvert qu'un segment de ce gène chez la drosophile était associé à la polarité cellulaire et a été nommé *Int-1*. Une mutation dudit gène entraînait des anomalies de segmentation importantes lors de l'embryogenèse de la drosophile (Baker, 1987). Ces anomalies pouvaient expliquer

l'absence d'ailes chez les drosophiles affectées. Quelques années plus tard, en 1991, ce gène a été renommé *Wnt1* (pour wingless integration site-1) et la famille moléculaire reconnue comme étant la voie Wnt (Nusse et al., 1991). Subséquemment, il a été découvert que les yeux vitreux notés près de 50 ans auparavant étaient dus à une mutation entraînant un gain de fonction du même gène (Brunner, Brunner, Fu, Hafen, & Basler, 1999). Un gène orthologue et plusieurs autres molécules de la même famille ont par la suite été identifiés chez les vertébrés.

1.5.3 Composantes de la voie Wnt chez les mammifères

Chez l'humain et la souris, la famille des WNTs inclue 19 molécules de signalisation (WNT1, WNT2, WNT2b/13, WNT3, WNT3a, WNT4, WNT5a, WNT5b, WNT6, WNT7a, WNT7b, WNT8a, WNT8b, WNT9a, WNT9b, WNT10a, WNT10b, WNT11, WNT16) 10 récepteurs Frizzled (FZD), plusieurs autres récepteurs (tels que ROR, PTK7, RYK, MUSK) et une multitude de molécules secondaires impliquées dans la régulation de l'expression des *Wnts* (DKK1, SFRP, WIF, Sclerostin, etc.) et des différents rôles décrits précédemment (Q. Chen et al., 2009; Hayashi, Burghardt, Bazer, & Spencer, 2007; Hayashi et al., 2009; Kikuchi, Yamamoto, Sato, & Matsumoto, 2011; Niehrs, 2012). Les FZDs travaillent conjointement avec des corécepteurs, dont LRP5 et LRP6, pour se lier avec les WNTs. On retrouve aussi les protéines (SFRPs). Les SFRPs sont des protéines contenant un domaine riche en cystéine et sans passage transmembranaire, ce qui leur permet de lier les WNTs et inhiber leur activité (Kawano & Kypta, 2003).

1.5.4 Mécanismes de la voie Wnt

L'expression des *Wnts* se fait principalement selon trois voies de signalisation classifiées comme étant canoniques (dépendantes de la β -catenin) ou non-canoniques (indépendantes de la β -catenin). Leur mode d'action est généralement local et on leur attribue une fonction autocrine et paracrine (Green et al., 2013; Hoppler & Moon, 2014; Takase & Nusse, 2016). Plusieurs molécules WNTs agissent préférentiellement selon certaines voies, mais la vaste implication de ces molécules et les nombreux récepteurs impliqués permettent difficilement de classifier chaque molécule selon une voie spécifique (Niehrs, 2012). Certaines préférences seront toutefois abordées.

1.5.4.1 La voie canonique (Wnt/ β -catenin)

Cette voie est ainsi appelée de par l'implication de la β -catenin comme coactivatrice de transcription (Figure 8). *Wnt1*, *Wnt3*, *Wnt3a*, *Wnt7a* et *Wnt8* ont une préférence pour cette voie de signalisation (Hernandez Gifford, 2015; Niehrs, 2012; Stapp, Gomez, Gifford, Hallford, & Hernandez Gifford, 2014; Tepekoy, Akkoyunlu, & Demir, 2015).

En l'absence de stimulation par les WNTs, la β -catenin est liée par différentes protéines, dont l'Axin, l'APC, la GSK3, la caséine kinase I et la protéine F-box. Ces protéines forment un «complexe de destruction» entraînant la dégradation de la β -catenin phosphorylée par β -TrCP (Aberle, Bauer, Stappert, Kispert, & Kemler, 1997; Sonderegger et al., 2010). La liaison de la molécule WNT à son récepteur FZD avec corécepteur LRP5/6 provoque un signal envoyé au complexe de destruction à l'aide de la protéine Disheveled (Dsh), ce qui entraîne le recrutement du complexe de destruction par le récepteur et empêche ainsi la phosphorylation et l'ubiquitination de la β -catenin (Zeng et al., 2005). De façon plus spécifique, la protéine Axin se lie au corécepteur LRP5/6 qui a été phosphorylé suite à une réaction catalysée par CK1 γ et/ou GSK3, indiquant que ces deux molécules ont différents rôles à jouer dépendamment de leur localisation (influence négative avec β -catenin vs. influence positive avec LRP5/6) (Komiya & Habas, 2008). La protéine Dsh est ensuite phosphorylée (activée) par plusieurs kinases. Une fois activée, elle inhibe l'activité de GSK3. Il y a par la suite stabilisation et accumulation de β -catenin dans le cytoplasme de la cellule, suivi de sa translocation dans le noyau. Une fois dans le noyau, la β -catenin agit comme coactivatrice de la transcription avec différents facteurs de transcription, principalement T cell factor/Lymphoid enhancer factor (TCF/LEF). Cette coactivation permet l'expression des gènes cibles de la voie Wnt (Hernandez Gifford, 2015; Niehrs, 2012; Stapp et al., 2014; Tepekoy et al., 2015). Les gènes inclus ont principalement un rôle à jouer dans la prolifération cellulaire et la migration cellulaire, tels que *c-myc*, *c-jun*, *cyclin D1*, *CD44*, *MMPs*, *uPAR*, (etc) (Sonderegger et al., 2010) de même que des gènes associés à l'orientation lors de l'embryogenèse tels *Siamois* et *Twin* (Komiya & Habas, 2008). L'inhibition de cette voie peut se faire notamment par les SFRPs et les DKKs ou encore par des inhibiteurs de la β -catenin tels ICAT (Inhibitor of β -catenin) et Chibby (Sonderegger et al., 2010).

1.5.4.2 La voie non canonique

La voie non-canonique se divise en la voie de la polarité planaire (PCP) et la voie calcique (figure 8). Ces dernières sont indépendantes de la β -catenin (Niehrs, 2012). *Wnt2*, *Wnt4*, *Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt6*, *Wnt7b* et *Wnt11* ont une préférence pour la voie non-canonique (Komiya & Habas, 2008; Niehrs, 2012; Tepekoy et al., 2015).

La voie PCP (polarité planaire)

La polarité planaire est décrite comme étant l'organisation des cellules selon un plan axial déterminé et contribuant à l'organisation, la morphogenèse et la fonction d'un tissu. Elle est établie par l'expression d'une multitude de gènes, dont les Wnts, entraînant une polarisation locale permettant aux cellules adjacentes de s'orienter et s'organiser entre elles (Butler & Wallingford, 2017). Dans cette voie, la liaison de WNT avec son récepteur FZD (indépendant de LRP5/6) provoque l'activation de la Dsh. Cette protéine est ensuite responsable de l'activation de deux voies parallèles de par la présence de deux domaines différents à sa surface, soit PDZ et DEP. Cela provoque une cascade de signalisation qui entraîne l'activation des GTPases Rac1 et Rhoa. L'activation de la Rho se fait par l'induction du complexe Dsh-Daam-1. Il s'en suit l'activation de kinases associées à la Rho (ROCK) et de la myosine, ce qui entraîne des modifications du cytosquelette par la polymérisation de l'actine et la stabilisation des microtubules. L'activation de Rac1 entraîne pour sa part la stimulation de JNK, favorable à l'expression de différents gènes en lien avec la polarité cellulaire et la migration cellulaire (Komiya & Habas, 2008; Niehrs, 2012).

La voie calcique

Dans cette voie, l'activation du récepteur FZD par la molécule WNT entraîne l'activation de la Dsh qui active par la suite la phosphodiesterase PDE et la PLC. La PDE inactive la PKG alors que la PLC active IP3. Ces interactions entraînent le relâchement de calcium intracellulaire par des protéines G. L'accumulation de calcium entraîne par le fait même l'activation de nombreuses protéines telles que la protéine kinase C (PKC), la kinase II dépendante au calcium/calmoduli (CamKII) et la calcineurine. La PKC provoque (via CDC42) la polymérisation de l'actine alors que la calcineurine favorise l'activation de facteurs nucléaires (tel NFAT) régulant l'expression de gènes associés à la migration cellulaire et la différenciation

cellulaire. La CamKII et la PKC peuvent aussi inhiber la voie canonique à plusieurs niveaux (Komiya & Habas, 2008; Niehrs, 2012; Sonderegger et al., 2010). Cette inhibition se fait notamment par la Kinase Nemolike (NLK) qui entraîne la phosphorylation de TCF/LEF. Cela entraîne l'inhibition des interactions entre le TCF/LEF et la β -catenin (Harwood, Cross, Radford, Haac, & De Vries, 2008).

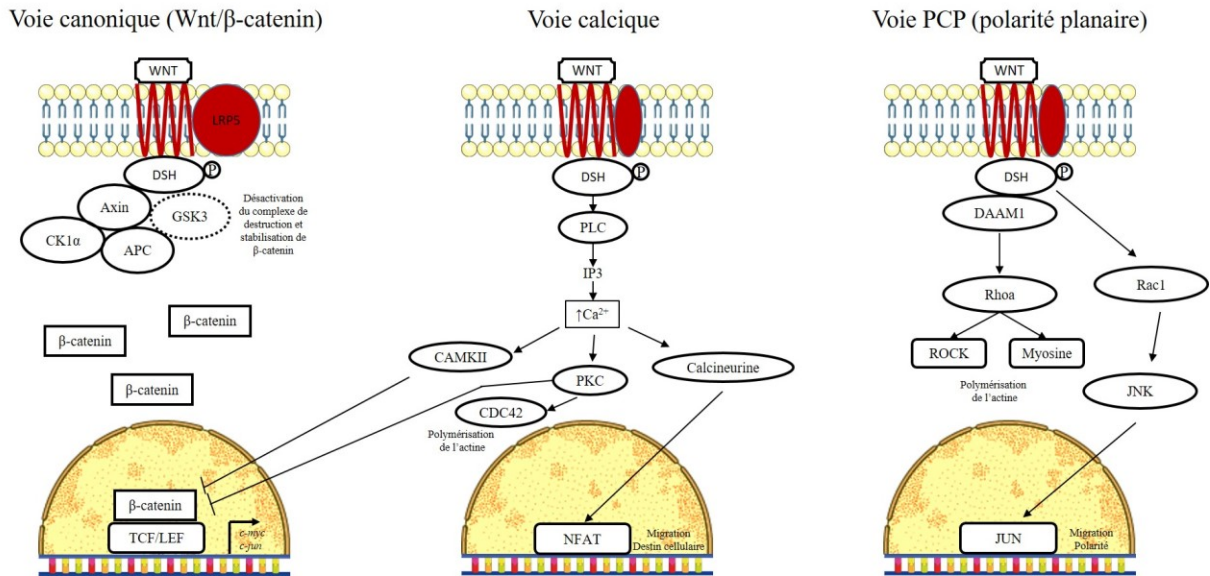


Figure 8. Mécanismes de la voie Wnt

Inspirée de Niehr (2012),

Certaines composantes de la figure (noyau, ADN, membrane cytoplasmique) sont issues de SMART service medical art (licence commune)

1.5.5 Expression générale de la voie Wnt dans l'utérus murin

1.5.5.1 Expression dans les canaux de Müller

Dans l'embryon, *Wnt7a* est retrouvé dans l'épithélium des canaux de Müller (évident à E17.5) (Miller & Sassoon, 1998). *Wnt4* et *Wnt5a* sont exprimés dans le stroma des canaux (Mericskay, Kitajewski, & Sassoon, 2004; Vainio et al., 1999). *Wnt4* est présent dans le mésonephron et les gonades dès E10. Il se retrouve (et persiste) dans le mésenchyme des canaux de Müller à E12.5 (Vainio et al., 1999). *Wnt5a* présente un patron d'expression similaire (Pavlova, Boutin, Cunha, & Sassoon, 1994).

1.5.5.2 Expression dans l'utérus adulte

Chez la souris, les analyses RT-PCR ont mis en évidence la présence d'ARN de 10 des 19 gènes *Wnts* (*Wnt2*, *Wnt2b*, *Wnt4*, *Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt7a*, *Wnt7b*, *Wnt10a*, *Wnt11*, *Wnt16*) et 8 des 10 récepteurs *Fzd* (*Fzd2*, *Fzd3*, *Fzd4*, *Fzd6*, *Fzd7*, *Fzd8*, *Fzd9* et *Fzd10*) dans l'utérus adulte. Les analyses d'hybridation n'ont toutefois pu déceler que *Wnt4*, *Wnt5a*, *Wnt7a*, *Wnt7b*, *Wnt11*, *Wnt16*, *Fzd2*, *Fzd4* et *Fzd6* (Hayashi et al., 2009; Hayashi et al., 2011).

Chez l'adulte, *Wnt5a* est exprimé dans le mésenchyme utérin (stroma) et vaginal et est régulé en partie par le cycle œstral (Mericskay et al., 2004; Miller & Sassoon, 1998). *Wnt4* est exprimé dans le stroma des nouveau-nés et est aussi influencé par le cycle œstral (Miller & Sassoon, 1998). *Wnt7a* est exprimé après la naissance et chez l'adulte dans l'oviducte et l'épithélium luminal utérin (Miller & Sassoon, 1998).

1.5.5.3 Expression durant la gestation

Chez la souris, l'expression de *Wnt4*, *Wnt5a*, *Wnt7a*, *Wnt7b*, *Wnt11*, *Wnt16*, *Fzd2*, *Fzd4* et *Fzd6* est notamment détectée dans l'utérus lors de la phase d'implantation. Par exemple, *Wnt4* est observé de façon abondante dans la décidua maternelle au jour E5 et n'est pas observé dans les régions sans sites d'implantation. *Wnt5a* est observé dans le stroma de E1 à E4 et la décidua mésométriale à E6 et E7. *Wnt7a*, *Wnt7b* et *Wnt11* sont abondants dans les épithéliums de l'endomètre. *Wnt7a* et *Wnt7b* sont observés dans l'épithélium endométrial des sites d'implantation lors du jour E5 et diminuent par la suite. *Wnt11* augmente dans l'épithélium luminal et les glandes mésométriales avant l'implantation (jours E4 et E5) et demeure abondante au site d'implantation. *Wnt16* est observé dans le stroma près de l'épithélium luminal au jour E4. *Fzd2* est présent dans la décidua, *Fzd4* dans les vaisseaux et le stroma autour de l'embryon et *Fzd6* dans l'épithélium endométrial (Hayashi et al., 2009). La voie Wnt/ β -catenin participe au développement de l'embryon en phase préimplantation et est essentielle pour le maintien de la fonction normale du blastocyste durant l'implantation (Tepekoy et al., 2015). L'expression des *Wnts* se localise principalement aux sites cibles de l'implantation, nécessitant la présence du blastocyste pour débiter son expression (Q. Chen et al., 2009; Mohamed et al., 2005). Une autre étude a aussi mis en évidence l'expression de *Wnt6* dans l'utérus durant la phase post-implantation, avec un pic d'expression durant le jour E5 et une expression marquée dans les cellules stromales en prolifération lors du jours E6 (Q. Wang et al., 2013).

1.5.6 Rôles des WNTs dans le développement et la fonction de l'utérus

De nombreuses molécules de la voie de signalisation Wnt sont rapportées comme étant impliquées dans le développement et la fonction de l'utérus. Parmi celles-ci, *Wnt4* et *Wnt5a* exercent des rôles clés et ont un intérêt prépondérant dans le cadre de ce projet. *Wnt7a* demeure aussi intéressant de par son implication dans la régulation de *Wnt4* et *Wnt5a*. Cette section portera une attention particulière aux rôles de ces derniers, avant de conclure avec un résumé de quelques autres molécules de la voie impliquées dans le développement de l'utérus.

1.5.6.1 Rôles de *Wnt4*

Le développement des canaux de Müller nécessite l'implication primordiale de *Wnt4* (Prunskaitė-Hyyryläinen et al., 2016; Vainio et al., 1999). L'inactivation de *Wnt4* chez des souris entraîne notamment la disparition des canaux de Müller au jour E11,5/E12,5, et ce chez les deux sexes (Vainio et al., 1999). Cette étape de développement peut, en partie, être régulée par l'action de *Wnt9b* (agissant en amont de *Wnt4*), mais aussi par *Pax2* (agissant en aval de *Wnt4*), *Lim1* (agissant en amont de *Wnt4*) et *Emx2* (Bernard & Harley, 2007).

Différents modèles d'inactivation conditionnelle de *Wnt4* dans l'utérus résultent en une absence de glandes endométriales (Franco et al., 2011; Prunskaitė-Hyyryläinen et al., 2016). Un modèle utilisant le système *PR^{Cre}* génère des souris femelles avec des anomalies de l'épithélium utérin (multicouche avec marquage pour p63) et une diminution du nombre de glandes utérines et de gènes associés (tel *Lif*) comparativement aux contrôles (Franco et al., 2011). *Lif* a aussi la capacité d'augmenter l'expression de *Wnt4*. Son absence aggrave donc les problèmes de fertilité et le développement des glandes (Filant & Spencer, 2013).

Wnt4 participe à la décidualisation en permettant la différenciation et la survie cellulaire par la médiation de la progestérone et *Foxo1*. Il contribue aussi à l'invasion du stroma utérin par l'embryon lors de l'implantation, tel que démontré avec le système *PR^{Cre}*. Ce modèle est caractérisé par une diminution dans l'expression de gènes associés à la décidualisation, dont *Bmp2*, *Fst* et *Id1* chez les souris mutantes (inactivation de *Wnt4*). Cette anomalie de décidualisation ne semble pas être en lien avec la diminution du nombre de glandes endométriales aussi rapporté dans ce modèle (Franco et al., 2011). D'ailleurs, chez l'humain, il a été démontré que *Wnt4* agit en aval de *Bmp2* et qu'il peut utiliser la voie canonique pour

favoriser la différenciation des cellules stromales de l'endomètre et permettre la décidualisation (Q. Li et al., 2013).

1.5.6.2 Rôles de *Wnt5a*

Le développement postérieur de l'utérus est en grande partie associé à l'expression de *Wnt5a*. L'inactivation de *Wnt5a* résulte en une absence des structures postérieures de l'utérus (col utérin et vagin) et une diminution de la longueur et de la taille des cornes utérines (Mericskay et al., 2004).

Wnt5a est requis dans le stroma utérin pour le développement glandulaire. Il agit conjointement avec *Wnt7a* (de par leur expression juxtaposée) dans le but de contrôler la formation des glandes. Le rôle exact de ce dernier demeure incertain. Il pourrait toutefois favoriser le développement d'un environnement permissif au développement des glandes ou encore être nécessaire pour la survie de précurseurs glandulaires lors de l'embryogenèse (Mericskay et al., 2004).

Additionnellement, il a été noté que son interaction paracrine (de l'utérus) avec le conceptus permet de stimuler le mouvement cellulaire et la migration de ce dernier (Hayashi et al., 2007). Il semble aussi jouer un rôle, du moins chez l'humain, dans la décidualisation endométriale de par la médiation de la progestérone (Matsuoka et al., 2010). De plus, l'altération de la voie WNT5a-ROR (un médiateur de la voie non-canonique) entraîne une désorganisation des projections épithéliales de l'épithélium luminal de l'utérus. Il en résulte des anomalies dans la formation des cryptes nécessaires à l'implantation de l'embryon (chambre d'implantation). Dans le cas de surexpression de la voie WNT5a-ROR, il y a une persistance de la polarité cellulaire apicobasal et rétention de microvillosités de surface, ce qui rend difficile l'adhésion du trophoctoderme embryonnaire. L'expression de *Bmp2* est aussi compromise dans ce modèle, ce qui diminue l'efficacité de la décidualisation (Cha et al., 2014).

1.5.6.3 Rôles de *Wnt7a*

Wnt7a contribue à la différenciation et la formation des dérivés des canaux de Müller, principalement dans la région postérieure du système reproducteur femelle. Cet effet est dû aux importantes interactions épithéliales-mésenchymateuses qui ont lieu durant le développement du tractus ainsi que la régulation de l'expression d'autres gènes de la voie Wnt, dont *Wnt4* et

Wnt5a. Cela exerce une influence sur l'orientation cellulaire, la cytodifférenciation, la prolifération cellulaire et le développement des glandes endométriales (Carta & Sassoon, 2004; Miller & Sassoon, 1998; Parr & McMahon, 1998). Des souris femelles avec une invalidation de *Wnt7a* sont infertiles. Cette infertilité s'explique par la présence d'utérus sous-développés, amincis et rétrécis, accompagnés de malformations de l'oviducte et d'altérations dans la morphologie cellulaire. Le stroma utérin de ces souris est peu abondant, surmonté d'un épithélium stratifié (caractéristique habituellement réservée au vagin) et ne contient pas de glandes. Les couches musculaires sont présentes, mais épaissies, irrégulières et désorganisées (Miller & Sassoon, 1998). Ces changements sont parfois observés dans le cas de toxicité au diethylstilbestrol, une molécule synthétique analogue à l'œstradiol (Sassoon, 1999). On observait une diminution de l'expression de *Wnt5a* chez l'adulte mutante, une expression atypique de *Wnt4* dans l'épithélium des souris mutantes et une diminution de l'expression de *Hoxa10* et *Hoxa11* (gènes associés à l'orientation cellulaire lors du développement embryonnaire) dans l'utérus des souris en développement (Miller & Sassoon, 1998).

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de *Wnt7a* dans la genèse des glandes. Une étude spécifique a mis en évidence son rôle à l'aide d'une invalidation conditionnelle postnatale à l'aide du système *PR^{Cre}*. Contrairement aux modèles embryonnaires, les souris mutantes femelles n'ont pas d'anomalies morphologiques visibles dans le vagin ou le col utérin. Les souris sont infertiles, l'utérus ne contient pas de glandes endométriales et il y a une dérégulation de l'expression des gènes *Foxa2*, *Hoxa10*, *Hoxa11*, *Msx1* et *Wnt16* (gènes possiblement associés au développement des glandes et à l'implantation) (Dunlap et al., 2011; Salleh & Giribabu, 2014).

Wnt7a est important pour l'implantation de l'embryon de par son rôle dans le développement des glandes endométriales (réceptivité utérine et décidualisation) et l'expression de plusieurs gènes associés (*Foxa2*, *Lif*, *Msx1*) (Dunlap et al., 2011). De façon similaire à *Wnt5a*, l'action paracrine de *Wnt7a* à l'égard du trophoctoderme du conceptus stimule la prolifération cellulaire et la transcription de gènes spécifiques, tels *Msh2* et *Myc*, ce qui favorise son développement (Hayashi et al., 2007).

1.5.6.4 Rôles additionnels

Plusieurs rôles additionnels ont pu être confirmés par l'invalidation de *Porcn* (PORCUPINE), une protéine essentielle pour le transport et la sécrétion des WNTs, en utilisant *PR^{Cre}*. Il en résulte une absence de glandes et des anomalies de prolifération stromale. Ce modèle suggère que les WNTs ne semblent pas essentiels pour la formation initiale des glandes, mais ce serait plutôt pour leur maintien suivant la puberté. L'ajout de WNT7a exogène était suffisant pour prévenir la perte des glandes alors que l'ajout de WNT5a exogène permettait de maintenir la prolifération endométriale. Ces éléments sont en concordance avec les lieux d'expression de ces protéines (Farah, Biechele, Rossant, & Dufort, 2017b). Il est intéressant de noter que les utérus de souris femelles hétérozygotes adultes (*Porcn^{Δ/+}* ; *Pgr^{Cre/+}*) contenaient des glandes endométriales. Ces dernières étaient toutefois kystiques et hyperplasiques. Une sous-fertilité était notée chez ces individus. Elle était toutefois due à une diminution de la réponse à l'œstrogène (Farah, Biechele, Rossant, & Dufort, 2018).

Un modèle d'invalidation de *Porcn* ciblant spécifiquement l'épithélium utérin (luminal et glandulaire) suite à l'administration d'œstrogène (*LTR^{Cre}* induit à la tamoxifène) a aussi démontré une diminution du nombre de glandes endométriales. Ce modèle était davantage similaire à ceux décrits précédemment, car l'absence de PORCUPINE dans l'épithélium a entraîné des dérégulations dans l'expression stromale de divers WNTs. Les souris femelles étaient infertiles suite à des anomalies de décidualisation et d'implantation. Ce résultat suggère que les interactions entre les divers *Wnts* exprimés dans l'épithélium et le stroma sont essentielles pour le maintien de la fertilité (Farah, Biechele, Rossant, & Dufort, 2017a).

Une multitude d'autres gènes de la famille *Wnt* (ou pouvant interagir avec cette dernière) ont été reconnus comme pouvant participer au développement et à la fonction de l'utérus. Ces derniers sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1. Gènes additionnels de la famille Wnt impliqués dans le développement et la fonction de l'utérus.

Gène	Système	Phénotype	Informations additionnelles
β -catenin	Activation constitutive via <i>Amhr2</i> ^{Cre} (<i>Amhr2</i> -Cre(Δ /+); <i>Ctnnb1</i> ex3(f/+))	-Absence d'oviducte -Malformation utérine -Absence de glandes endométriales	-Diminution de la prolifération épithéliale -Délai dans la formation des glandes -Transition épithéliale-mésenchymale dans le mésenchyme de Müller (C. A. Stewart et al., 2013)
<i>Cdh1</i>	Inactivation conditionnelle à l'aide de <i>Pgr</i> ^{Cre}	-Absence de glandes dans l'utérus néonatal -Prolifération épithéliale anormale accompagnée d'apoptose massive -Défauts d'implantation et de décidualisation	-Diminution de l'expression de cytokératine 8 et de CD10 -Perte de jonctions intercellulaires (occludine, ZO-1) - Diminution de l'expression <i>Wnt7a</i> , <i>Wnt11</i> , <i>Fzd6</i> , <i>Fzd10</i> , <i>Hoxa10</i> , <i>Hoxa11</i> , <i>Msx1</i> et <i>Msx2</i> (Reardon et al., 2012)
<i>Lgr4</i>	Inactivation conditionnelle utilisant <i>K5</i> ^{Cre} (épithélium, dont l'utérus)	-Différenciation épithéliale altérée -Diminution du nombre de glandes utérines -Défaut de décidualisation	- Diminution de l'expression des gènes <i>Lef1</i> , <i>Wnt4</i> , <i>Wnt5a</i> et <i>Wnt7a</i> dans l'utérus. (Sone et al., 2013)
<i>Vangl2</i>	Inactivation via mutation dans la région Lp (loop tail)	-Anomalies de polarité épithéliales -Quantité accrue de muscle lisse combinée à une diminution du stroma endométrial -Anomalie dans la fusion des cornes utérines dans la région du col	-Diminution de l'expression de <i>Wnt7a</i> -Anomalies dans l'orientation et organisation des cellules mésenchymateuses stromales (Vandenberg & Sassoon, 2009)
<i>Wnt6</i>	Inactivation totale de <i>Wnt6</i> via le remplacement d'un fragment (exon 3/4)	-Anomalies de fertilité dues à une réponse déciduale défaillante.	-Alteration de la progression du cycle cellulaire via diminution de l'expression de <i>Ccnb1</i> lors de la phase G2/M du cycle cellulaire.(Q. Wang et al., 2013)

1.5.7 Implication de la voie Wnt dans les maladies utérines

1.5.7.1 Cancers utérins

Les cancers endométriaux sont les cancers gynécologiques les plus fréquents rencontrés chez la femme. Ils peuvent être issus des différents types cellulaires retrouvés dans le corps de l'utérus et sont classifiés selon leurs caractéristiques histologiques distinctes. Les cancers utérins d'origine épithéliale (épithélium de surface) incluent les carcinomes endométrioïdes, les carcinomes séreux, les carcinomes à cellules séreuses, les carcinomes mucineux, les carcinomes spinocellulaires, les carcinomes des cellules transitionnelles, les carcinomes à petites cellules et les carcinomes indifférenciés. Les tumeurs d'origine mésenchymateuse incluent les tumeurs

stromales endométriales ainsi que les tumeurs musculaires (leiomyome, leiomyosarcome). S'ajoutent à ces dernières des tumeurs mixtes (carcinosarcomes) (Murali, Soslow, & Weigelt, 2014).

Les cancers endométriaux sont grossièrement classifiés en deux grandes catégories cliniques ; Type 1 et Type 2. Le type 1 est caractérisé par des tumeurs bien différenciées souvent accompagnées d'invasion superficielle du myomètre, une grande sensibilité à la progestérone et dont le pronostic est généralement favorable (Bokhman, 1983). Ces derniers sont souvent associés à l'obésité et à des déséquilibres hormonaux. Près de 90% de ces cancers sont de type 1 dont le plus fréquent est le carcinome endométrioïde.

Le type 2, moins fréquent, est souvent moins bien différencié, plus malin, accompagné de métastases et ayant une réponse faible à la progestérone (Bokhman, 1983). Le pronostic est habituellement très bon lorsqu'il s'agit de tumeurs de faible grade diagnostiquées de façon précoce. Toutefois, près de 30% des cas sont diagnostiqués tardivement, souvent accompagnés de métastases lorsque le grade est élevé (Coopes, Henry, Llamosas, & Ford, 2018).

Les cancers cervicaux, moins fréquents qu'endométriaux, émergent du col utérin. Le col utérin est composé de tissu fibreux surmonté soit d'un épithélium glandulaire dans sa région distale, soit d'un épithélium pavimenteux dans sa région proximale. Les cancers cervicaux les plus fréquents sont issus de l'épithélium pavimenteux (carcinome spinocellulaire) suivi des adénocarcinomes de l'épithélium glandulaire (Board, 2002). Les cancers cervicaux sont relativement fréquents chez les jeunes femmes de par l'implication du Virus du Papillome Humain (VPH) dans leur pathogénèse (Suneja & Viswanathan, 2020).

La voie Wnt, principalement la canonique (dépendante de la β -catenin), a été rapportée comme étant impliquée dans les cancers endométriaux depuis plus de deux décennies. Une étude initiale a rapporté une accumulation de β -catenin dans près de 40% des cancers endométriaux ainsi qu'une mutation dans le gène de la β -catenin (principalement l'exon 3) dans près de 12% des cancers (Fukuchi et al., 1998). Des résultats similaires ont par la suite été rapportés par une multitude d'études et suggèrent que des mutations dans le gène de la β -catenin seraient observées dans près de 25% des cancers (Byron et al., 2012; Coopes et al., 2018; McConechy et al., 2014). Des études subséquentes ont mis en évidence l'implication probable d'une multitude de composantes de la voie Wnt. On observerait notamment une augmentation de l'expression de gènes de la voie Wnt dans des cancers comprenant des mutations de β -catenin,

dont *WNT5a*, *FZD8*, *FZD10*, *SRY*, *TCF7*, et *LEF1* (Y. Liu et al., 2014; Wasniewski et al., 2019). *WNT7a* a aussi été rapporté comme étant surexprimé dans les cancers endométriaux et étant associé à un pronostic plus sombre (Y. Liu, F. Meng, et al., 2013; Peng et al., 2012). Il en est de même lorsqu'on observe une diminution de l'expression d'inhibiteurs de la voie Wnt dont *DKK1* et *DKK3* (Eskander et al., 2016; Yi, Liao, Li, & Xiong, 2009). *WNT7a* peut aussi participer à la prolifération et la migration des cellules tumorales dans les cancers cervicaux (Ramos-Solano et al., 2015).

L'implication de la voie non-canonique demeure encore méconnue. Toutefois, quelques études ont mis en évidence l'expression de ROR1, une protéine transmembranaire capable de lier WNT5a et activer la voie PCP dans les cancers endométriaux (S. Zhang et al., 2012). ROR2, une protéine similaire, peut aussi être exprimée. Elle semble toutefois présenter un rôle opposé à celui observé dans le cas de ROR1, soit en agissant comme suppresseur de tumeur (Henry et al., 2018).

1.5.7.2 Endométriose

L'endométriose est une maladie caractérisée par la présence de tissus endométrial ectopique accompagné de douleur et d'inflammation chronique. Les sites communément atteints sont les ovaires (plus de 90% du temps), les trompes de Fallope, la cavité pelvienne et les ligaments utérosacraux. On peut rarement retrouver des lésions dans le tractus digestif, le système urinaire et la cavité thoracique (Hyun Ju Lee, Park, Jee, Kim, & Suh, 2015). Chez la femme, les menstruations rétrogrades combinées avec d'autres facteurs de risque (tel la génétique) sont suggérés comme causes (Greene et al., 2016). La pathogenèse de la maladie inclue une phase de croissance et de prolifération souvent accompagnée de fibrose et de transition épithéliale-mésenchymateuse (Matsuzaki et al., 1999; Matsuzaki & Darcha, 2012). La voie Wnt semble impliquée à divers degrés dans la régulation de ces processus.

De nombreuses composantes et gènes cibles de la voie Wnt sont différenciellement exprimés dans l'endométriose chez l'humain, ce qui a parfois été confirmé à l'aide de modèles animaux (Brueggmann, Jaque, Lee, Pearce, & Templeman, 2016; de Mattos et al., 2016; Heinosalo et al., 2018; Matsuzaki, Darcha, Maleysson, Canis, & Mage, 2010). Parmi ces gènes, *Sfrp2* et le gène de la β -catenin sont grandement exprimés dans l'épithélium et le stroma de tissu issu de lésions d'endométriose. Ils régulent la croissance et la prolifération des lésions

(Heinosalo et al., 2018). Ce phénomène est souvent exacerbé par une diminution de l'expression de l'inhibiteur *DKK1* et une diminution de l'activation de GSK-3 β (Pazhohan et al., 2018).

L'œstrogène, essentiel pour la physiologie utérine et la prolifération cellulaire, est aussi capable de signaler via la voie Wnt, en permettant d'augmenter l'expression de *Wnt4* et *Wnt5a* et stabiliser la β -catenin (Hou, Tan, Li, Dey, & Das, 2004). Via cette signalisation, l'œstrogène serait capable d'augmenter les niveaux d'expression de *VEGF* et *MMP9* et ainsi contribuer à l'angiogenèse et au remodelage de la matrice extracellulaire essentielles pour l'implantation et la croissance des lésions d'endométriose (L. Zhang, W. Xiong, Y. Xiong, H. Liu, N. Li, et al., 2016; L. Zhang, Xiong, Xiong, Liu, & Liu, 2016). La protéine FOXP1, signalant entre autres via la voie Wnt, est aussi associée à une augmentation de la fibrose dans les lésions endométriales (Shao & Wei, 2018).

L'utilisation d'inhibiteurs de la voie Wnt serait une possible avenue thérapeutique pour l'endométriose (Matsuzaki & Darcha, 2013a, 2013b).

1.5.7.3 Le syndrome Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser

Le syndrome Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) est décrit comme étant l'absence congénitale de l'utérus et de la portion crâniale du vagin sans anomalies ovariennes notables. Le syndrome peut être séparé en deux types : le type 1 caractérisé par des anomalies gynécologiques seulement, et le type 2 caractérisé par des malformations extragénitales, dont des anomalies rénales, squelettiques, auditives, cardiaques et développementales (Ledig & Wieacker, 2018).

L'aplasie utérine et l'agénésie segmentaire vaginale sont les caractéristiques primaires de ce syndrome et son origine est essentiellement embryonnaire. Les sections précédentes ont présenté une multitude de gènes impliqués dans le développement de l'utérus, dont plusieurs sont impliqués dans l'étiologie du syndrome (Ledig & Wieacker, 2018).

De nombreux cas de MRKH ont été associés à des mutations de *WNT4* chez l'humain. Ces cas sont toutefois particuliers car souvent associés à de l'hyperandrogénisme (tel qu'observé chez les souris *Wnt4*^{-/-}) (Biaison-Lauber, Konrad, Navratil, & Schoenle, 2004). Il s'agit d'une caractéristique qui n'est habituellement pas associée au syndrome MRKH classique, suggérant qu'il pourrait s'agir d'un syndrome clinique distinct (Cheroki et al., 2006; Clement-Ziza et al., 2005).

1.6 VOIE HIPPO

1.6.1 Introduction

La voie Hippo est une cascade de kinases participant, chez l'embryon comme chez l'adulte, à la régulation de divers processus cellulaires dont la prolifération, la croissance cellulaire, la différenciation cellulaire et l'apoptose. Elle est essentiellement reconnue comme étant la voie régulant la taille des organes (Yu, Zhao, & Guan, 2015). Son rôle a été démontré dans le développement du cœur, des poumons, des reins, des muscles, des os, etc. (T. H. Chen et al., 2017; Heallen et al., 2011; Mahoney, Mori, Szymaniak, Varelas, & Cardoso, 2014; A. Reginensi et al., 2016; Reginensi et al., 2013; Y. Tang & Weiss, 2017; Watt et al., 2010).

Quelques particularités la distinguent des autres voies de signalisation. La voie ne possède pas de ligands spécifiques, contrairement à la voie Wnt, afin de stimuler son activité. Elle est plutôt activée par divers signaux extracellulaires capables de stimuler, selon le contexte biologique, diverses kinases de la voie. Les signaux les plus connus sont le contact cellulaire (densité cellulaire et jonctions intercellulaires), la tension mécanique, divers facteurs de croissance (récepteurs GPCR, WNTs), le stress cellulaire (hypoxie, stress oxydatif, stress énergétique), la polarité cellulaire, le cycle cellulaire, etc (Meng, Moroishi, & Guan, 2016).

Elle exerce, lorsqu'active, un rôle restrictif sur la prolifération. Dans le contexte des organes, la voie est active lorsque le contact et la densité cellulaire sont élevés. Cela restreint la prolifération excessive des cellules et permet le maintien de l'organe à sa taille normale. Lorsque la croissance est nécessaire, les signaux cellulaires (contact) sont insuffisants et la voie demeure inactive. Les cellules continueront ainsi de proliférer. Cela fait contraste avec plusieurs voies, dont Wnt, durant lesquelles l'activation promeut la prolifération. Le mécanisme expliquant cette particularité sera décrit dans les sections suivantes.

1.6.2 Découverte de la voie Hippo

Les différentes composantes de la voie ont initialement été identifiées chez la drosophile. Des études de dépistage génétique et de mosaïques ont permis de mettre en évidence le gène *warts*, dont les mutations entraînaient diverses anomalies développementales et de la surcroissance cellulaire (Justice, Zilian, Woods, Noll, & Bryant, 1995; Xu, Wang, Zhang, Stewart, & Yu, 1995). Des études subséquentes ont pu mettre en évidence les gènes *hippo*, *salvador*, et *mats* appartenant à un groupe similaire, catégorisés comme supprimeurs de tumeurs

pouvant interagir entre eux et dont les mutations entraînaient des phénotypes similaires à ceux décrits pour *warts*. (Harvey, Pflieger, & Hariharan, 2003; Z. C. Lai et al., 2005; Pantalacci, Tapon, & Leopold, 2003; Tapon et al., 2002; Wei, Shimizu, & Lai, 2007; Wu, Huang, Dong, & Pan, 2003). Durant la même époque, le coactivateur transcriptionnel *Yorkie* a été identifié et suggéré comme étant un potentiel effecteur de la voie Hippo suite à son interaction avec *warts* (Huang, Wu, Barrera, Matthews, & Pan, 2005). Ce dernier doit toutefois interagir avec les facteurs de transcription *Scalloped* afin de permettre la régulation des gènes cibles de la voie (Goulev et al., 2008; Wu, Liu, Zheng, Dong, & Pan, 2008).

1.6.3 Composantes de la voie Hippo chez les mammifères

Chez les mammifères, les gènes *Mst1* et *Mst2* sont les homologues de *Hpo*; *Lats1* et *Lats2* représentent *Wts*; *Sav1* représente *Sav*; *Mob1* représente *Mats*; *Yap* et *Taz* représentent *Yorkie*; et *Tead1-4* représentent *Scalloped* (Callus, Verhagen, & Vaux, 2006; E. H. Chan et al., 2005; Huang et al., 2005; Praskova, Xia, & Avruch, 2008; K. Wang, Degerny, Xu, & Yang, 2009; Lei Zhang et al., 2008).

Il est maintenant reconnu que les différentes kinases centrales de la voie Hippo sont conservées chez les mammifères et donc que la voie peut exercer des rôles similaires à ceux identifiés chez la drosophile. L'utilisation de certaines des protéines humaines est capable de sauver le phénotype associé à une mutation spécifique de son homologue chez la drosophile, indiquant la conservation de la fonction entre les deux espèces (Huang et al., 2005; Z. C. Lai et al., 2005; Tao et al., 1999; Wu et al., 2003).

Une courte description des principales composantes sera abordée dans les sous-sections suivantes.

1.6.3.1 MST1 et MST2

MST1 et MST2 sont des kinases de la sous-famille GCK-II partageant une grande similitude au niveau de leur structure (chez l'humain : 75% d'identité et sont environ identiques à 95% en ce qui concerne leurs domaines catalytiques). Elles possèdent une structure enroulée (coiled-coil) unique près de leur région carboxy-terminale. Cette structure, appelée domaine « SARAH », permet de réguler leur dimérisation et d'interagir avec d'autres molécules comprenant la même structure, dont *Sav1* (une autre molécule de la voie Hippo) (Galan &

Avruch, 2016; Khokhlatchev et al., 2002). Elles sont aussi capables de phosphoryler LATS1 et LATS2 à leurs motifs hydrophobiques localisés à leur site carboxy-terminal (E. H. Chan et al., 2005). Elles peuvent interagir avec une multitude d'autres substrats et facteurs de transcription et ainsi réguler divers processus dont l'apoptose, la différenciation, le développement embryonnaire et la régulation du cytosquelette (Galan & Avruch, 2016; P. Li et al., 2013; Matallanas et al., 2011). Ces deux protéines peuvent avoir des rôles individuels ou redondants selon le contexte biologique. L'inactivation de MST1 résulte en une diminution des niveaux de protéine Nore1B/RAPL associée à une diminution du nombre de lymphocytes T naïfs matures. Ce phénomène n'est pas observé lors d'inactivation de MST2 (D. Zhou et al., 2008). Toutefois, l'inactivation conjointe et conditionnelle de MST1 et MST2 confirme le rôle redondant et résulte en mortalité embryonnaire (utilisant *SOX2^{Cre}*) et développement de tumeurs hépatiques (utilisant *ALBUMIN^{Cre}*), notamment en contrôlant les niveaux de phosphorylation de YAP (H. Song et al., 2010).

1.6.3.2 LATS1 et LATS2

LATS1 et LATS2 sont des kinases sérine/thréonine appartenant à la sous-famille des AGC. Chez l'humain, ces protéines partagent une grande similitude dans leur séquence au niveau de leur domaine kinase à l'extrémité c-terminal (près de 85%). Toutefois, cette similarité diffère grandement dans l'extrémité n-terminal, alors que LATS1 contient un domaine riche en proline et LATS2 contient une séquence répétée PAPA (Hori, Takaori-Kondo, Kamikubo, & Uchiyama, 2000; Yabuta et al., 2000). De plus, LATS1 contient deux motifs PPxY comparativement à un seul pour LATS2 (Sudol, 2010). Ces motifs sont essentiels pour permettre les interactions avec les coactivateurs de la transcription YAP et TAZ. Elles partagent toutefois d'autres caractéristiques communes, comme un motif hydrophobique en regard de leur domaine catalytique ainsi que des séquences communes et des domaines ubiquitines dans la portion n-terminal (M. Kim, Kim, Park, Lee, & Lim, 2016). Ces variations dans la composition des deux protéines suggèrent qu'elles peuvent à la fois exercer des rôles similaires, voire synergiques, mais aussi indépendants selon les situations. Par exemple, l'inactivation totale de LATS2 chez des souris résulte en mortalités embryonnaires (McPherson et al., 2004). Cette mortalité est en partie due à la capacité de LATS2 de se localiser au centrosome. Le centrosome est une organelle capable d'organiser les microtubules cellulaires responsables d'une multitude de

fonctions, dont la division cellulaire (via la formation de fuseaux mitotiques), la motilité cellulaire, la polarité cellulaire, etc. (Schatten, 2008). L'absence de LATS2 entraînerait des dérégulations du cycle cellulaire (Yabuta et al., 2007). Au contraire, lors d'inactivation totale de LATS1, les souris naissantes survivent, mais développent une multitude de problèmes endocriniens (hypophyse), reproducteurs (cancers ovariens, anomalies de la glande mammaire) et cutanés (sarcomes) à l'âge adulte (St John et al., 1999). LATS1 peut aussi se localiser au centrosome et contribuer au cycle cellulaire, mais cet effet semble moins sévère que celui observé en absence de LATS2 (Nishiyama et al., 1999).

1.6.3.3 YAP et TAZ

YAP et TAZ sont les effecteurs principaux de la voie Hippo. Il s'agit de coactivateurs de transcription partageant aussi une grande similitude dans leur séquence et leur topologie (46% d'identité au niveau des acides aminés et 60% de similarité) (K. Wang et al., 2009).

YAP et TAZ ne possèdent pas de sites de liaison leur permettant de se lier directement à l'ADN (M. K. Kim, Jang, & Bae, 2018). Ils sont cependant caractérisés, entre autres, par la présence d'un ou plusieurs motifs WW, d'un motif de liaison TEAD, d'un motif de liaison 14-3-3, et d'un motif PDZ leur permettant de se lier à diverses molécules, dont une multitude de facteurs de transcription (Vassilev, Kaneko, Shu, Zhao, & DePamphilis, 2001; C. Zhu, Li, & Zhao, 2015). Les motifs WW de YAP et TAZ sont en effet capables de former un complexe avec les motifs PPxY présents sur plusieurs protéines et certains facteurs de transcription (LATS1, LATS2, AMOT, RUNX1/2, P73, TBX5, ErbB4, SMAD1, etc.) (H. I. Chen & Sudol, 1995; Macias et al., 1996; Piccolo, Dupont, & Cordenonsi, 2014). Le motif PDZ, pour sa part, est capable de se lier au domaine PDZ d'une multitude de protéines (H. J. Lee & Zheng, 2010).

YAP est séparé en deux isoformes différents (YAP1 et YAP2) résultant d'un épissage différentiel lors de la transcription/traduction (Sudol et al., 1995). YAP1 est caractérisé par la présence d'un domaine WW alors que YAP2 contient deux domaines WW. TAZ contient seulement un domaine WW. Il ressemble ainsi davantage à YAP1 (Kanai et al., 2000).

Cette homologie, bien que très élevée, demeure incomplète. YAP et TAZ peuvent ainsi accomplir des rôles similaires ou indépendants selon les contextes biologiques, un peu à l'image de LATS1 et LATS2 décrits précédemment (C. Tang, Takahashi-Kanemitsu, Kikuchi, Ben, & Hatakeyama, 2018). Par exemple, l'inactivation complète de YAP résulte en de la mortalité

embryonnaire associée à des anomalies vasculaires dans le sac vitellin ainsi qu'un défaut de fusion chorioallantoïque (Morin-Kensicki et al., 2006). L'invalidation complète de TAZ chez des souris ne résulte pas nécessairement en mortalité embryonnaire (bien que parfois observée). Les souris mutantes développent cependant une multitude de malformations rénales (kystiques) et pulmonaires (Makita et al., 2008).

1.6.3.4 TEAD

Les molécules TEADs sont des facteurs de transcription essentiellement reconnus comme étant les principaux collaborateurs de YAP et TAZ pour la régulation transcriptionnelle de la voie Hippo (Lin, Park, & Guan, 2017; Pobbati & Hong, 2013). Cet élément est important car l'activité transcriptionnelle individuelle des TEADs est faible et la présence de cofacteurs de la transcription est essentielle pour une efficacité optimale (Xiao, Davidson, Matthes, Garnier, & Chambon, 1991). Ils possèdent ainsi un domaine TEA/ATTS capable de se lier à l'ADN (reconnaissant principalement la séquence 5'-GGAATG-3') et un domaine C-terminal capable de se lier à divers coactivateurs de transcription (Anbanandam et al., 2006; L. Chen et al., 2010; K. C. Lin et al., 2017). À l'aide de divers collaborateurs, ils peuvent réguler une multitude de processus développementaux et physiologiques. L'invalidation des divers TEADs peut entraîner, entre autres, de la mortalité embryonnaire (TEAD1, TEAD4), des malformations cardiaques (TEAD1) et des malformations neurologiques (TEAD1/TEAD2 combinés) (K. C. Lin et al., 2017).

1.6.4 Mécanisme de la voie Hippo

La voie Hippo, lorsqu'active, permet de réguler la stabilité et l'activité transcriptionnelle de YAP et TAZ (Figure 9).

MST1 et MST2 sont reconnues comme étant les principales kinases en amont de la voie et par lesquelles débute la cascade. L'activation de ces kinases se fait via la phosphorylation des sites Thr183 pour MST1 et Thr180 pour MST2 (Praskova, Khoklatchev, Ortiz-Vega, & Avruch, 2004). Cette activation se fait soit via une interaction avec d'autres protéines, soit via un processus d'auto-phosphorylation par homodimérisation (Boggiano, Vanderzalm, & Fehon, 2011; L. Ni et al., 2013; Praskova et al., 2004). MST1 et MST2 peuvent par la suite former un complexe avec SAV1 via leur domaine SARA. Cette liaison permet de stabiliser et phosphoryler SAV1 (Callus et al., 2006; Tapon et al., 2002). Le complexe ainsi formé peut à la fois phosphoryler LATS1 (Thr1079), LATS2 (Thr1041) et MOB1 (Thr12 et Thr35) (E. H. Chan et al., 2005; Hoa et al., 2016; Praskova et al., 2008). Cette activation de LATS1 et LATS2 est suivie d'un processus d'auto-phosphorylation (Ser909 et Ser872 respectivement) (E. H. Chan et al., 2005; Hoa et al., 2016). MOB1 nouvellement activé peut se lier avec LATS1 et LATS2 pour accentuer la phosphorylation de ces sites (Hergovich, Schmitz, & Hemmings, 2006; Hoa et al., 2016). LATS1 et LATS2 peuvent, par la suite, phosphoryler YAP (Ser61, Ser109, Ser127, Ser164, Ser397) et TAZ (Ser66, Ser89, Ser117, Ser311) (Hao, Chun, Cheung, Rashidi, & Yang, 2008; C. Y. Liu et al., 2010; B. Zhao et al., 2007). YAP et TAZ phosphorylés sont retenus dans le cytoplasme ou dégradés selon les sites de phosphorylation activés. La phosphorylation de YAP à ser397 et TAZ à ser311 permet une phosphorylation subséquente par CK1 ϵ , la formation d'un phosphodegron (dégration), le recrutement de la ligase ubiquitine β -TrCP, l'ubiquitination et leur dégradation (C. Y. Liu et al., 2010; B. Zhao, Li, Tumaneng, Wang, & Guan, 2010). La phosphorylation de YAP à ser127 et TAZ à ser89 permet la formation d'un site de liaison pour la protéine 14-3-3 favorisant leur rétention cytoplasmique (Kanai et al., 2000; B. Zhao et al., 2007). La vertéporfine, une molécule thérapeutique, peut notamment inhiber les effets de YAP en augmentant les niveaux cytoplasmiques de la protéine 14-3-3 (C. Wang et al., 2015).

Lorsque la voie Hippo est inactive, YAP et TAZ demeurent actifs (non-phosphorylés) et peuvent ainsi se rendre au noyau (Figure 9). Ils peuvent se lier à divers facteurs de transcription, dont les plus importants sont la famille des TEADs, et permettre la transcription de gènes cibles de la voie. Ces gènes cibles, incluant *Ctgf* et *Cyr61*, régulent différents processus dont la

prolifération, la différenciation et l'apoptose (D. Lai, Ho, Hao, & Yang, 2011; Lei et al., 2008; Vassilev et al., 2001; B. Zhao et al., 2008).

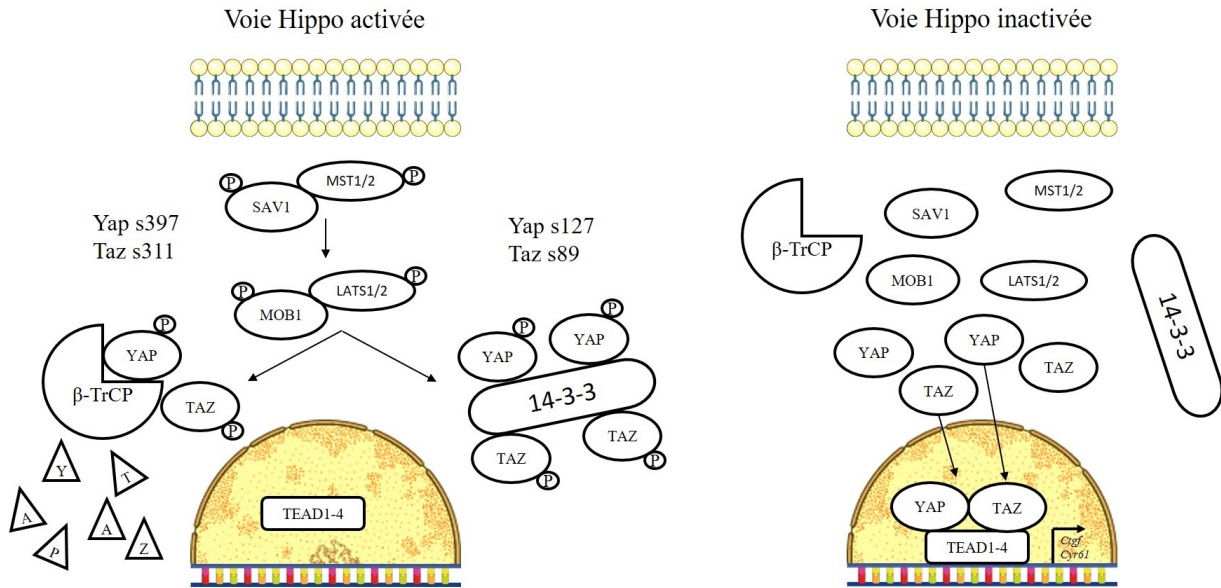


Figure 9. Mécanisme de la voie Hippo

Certaines composantes de la figure (noyau, ADN, membrane cytoplasmique) sont issues de SMART service medical art (licence commune)

1.6.5 Expression générale de la voie Hippo dans l'utérus murin

Il n'y a pas d'évidences dans la littérature de l'expression de la voie Hippo durant le développement des canaux de Müller. Certaines protéines de la voie ont toutefois été identifiées par immunohistochimie dans l'utérus adulte. Chez l'humain et le singe, TAZ est exprimé de façon très limitée dans le stroma endométrial, l'épithélium luminal et l'épithélium glandulaire (Strakova, Reed, & Ihnatovych, 2010; Maosheng Zhan et al., 2016). Chez le singe, il a été démontré que l'expression de TAZ diminuait dans le stroma en périphérie des sites de nidation au début de la gestation (Strakova et al., 2010). YAP, pour sa part, est faiblement exprimé dans le noyau et le cytoplasme des cellules de l'épithélium luminal et du stroma endométrial et plus fortement exprimé dans l'épithélium glandulaire et dans les cellules déciduales chez l'humain (H. Chen et al., 2017; Y. Song et al., 2016). LATS1 est exprimé dans les cellules stromales et épithéliales (glandulaire et luminal) (S. C. Lin et al., 2017). TEAD1 est fortement exprimé dans le noyau des cellules stromales et déciduales ainsi que l'épithélium glandulaire chez l'humain (H. Chen et al., 2017; Kessler, Bachurski, Schroeder, Stanek, & Handwerger, 2008).

1.6.6 Rôles de la voie Hippo dans le développement et la fonction utérine

Tel que mentionné précédemment, il n'y a actuellement pas d'évidences de l'implication de la voie Hippo pour le développement de l'utérus dans la littérature scientifique.

Chez l'adulte, les rôles rapportés sont très limités et principalement associés à la régulation de la décidualisation par YAP et TAZ. Il a été démontré dans un modèle *in vitro* de décidualisation que YAP augmentait dans les 48 premières heures de culture, avant de redescendre après 48h à 96h. L'invalidation de *Yap* à l'aide de shRNA (petit ARN en épingle) dans le même modèle a résulté en la diminution de l'expression de TEAD1 dans les cellules ainsi qu'un retard dans la décidualisation *in vitro* et une diminution significative de l'ARNm de marqueurs spécifiques au processus de décidualisation (*Prl8a2* et *Igfbp-1*). Ces résultats indiquent que YAP contribue au processus de décidualisation en stimulant la prolifération des cellules déciduales (H. Chen et al., 2017). Une portion des changements notés semble associée à un effet direct de la régulation des interactions avec TEAD1. Une étude précédente a notamment mis en évidence la capacité de TEAD1 à influencer directement l'activité du promoteur du gène de la prolactine déciduale (*Prl8a2*) dans un modèle de décidualisation *in vitro* (Kessler et al., 2008). Il a aussi été démontré que la protéine TAZ diminuait dans le noyau des cellules déciduales dans un modèle de décidualisation *in vitro* complétement d'IL1 β (imitant la présence d'un embryon). Les niveaux d'ARNm de *Taz* ne sont pas influencés par cet effet, suggérant un effet purement post-transcriptionnel. TAZ semble capable de réprimer l'expression de gènes médiés par les récepteurs PPAR γ , dont *Igfbp-1*. La diminution de TAZ nucléaire préviendrait ainsi l'effet répresseur sur le gène *Igfbp-1* et favoriserait ainsi la décidualisation des cellules au contact de l'embryon (Strakova et al., 2010).

Plus récemment, il a été démontré chez l'humain que la voie Hippo permet de maintenir la multipotentialité des cellules souches endométriales menstruelles. Dans ces cellules, l'activation de la voie Hippo résulte en la rétention cytoplasmique de TAZ, favorisant un phénotype prolifératif des cellules souches endométriales. Le traitement de ces cellules à l'aide de TGF- β est habituellement capable de stimuler la différenciation de ces dernières en myofibroblastes. Toutefois, la diminution de TAZ au niveau nucléaire est capable d'atténuer cette différenciation. Cela suggère que la présence de TAZ est essentielle pour l'induction de la différenciation myofibroblastique par TGF- β (H. Zhu et al., 2019).

1.6.7 Implications de la voie Hippo dans les maladies utérines

1.6.7.1 Cancers utérins

Les évidences de l'implication de la voie Hippo dans les maladies utérines demeurent limitées. Certaines recherches ont rapporté l'implication de YAP et TAZ dans divers cancers utérins. Des analyses immunohistochimiques effectuées sur des cancers endométriaux (type 1 et type 2) suggèrent que l'accumulation nucléaire de YAP dans les cellules tumorales pourrait être utilisée comme facteur pronostique. Une accumulation accrue serait associée à des grades histologiques plus élevés et une fréquence accrue de métastases. Des études *in vitro* à l'aide de lignés cancéreuses endométriales humaines suggèrent que cet impact est dû à l'augmentation de la prolifération cellulaire sous l'influence d'une accumulation nucléaire de YAP (Tsujiura et al., 2014). L'utilisation de vertéporfine pourrait aussi être une possible avenue thérapeutique pour les cancers endométriaux (C. Wang et al., 2015).

Un patron d'expression ainsi qu'un pronostic similaire sont observés dans les cancers cervicaux. YAP contribuerait à la progression des cancers utérins cervicaux en induisant la prolifération et la migration des cellules tumorales, notamment en interagissant avec la voie de signalisation TGF- α /EGFR (Chunbo He et al., 2015). Il est intéressant de noter que la protéine HPV16 E6 du papillome humain, responsable d'une grande partie des cancers endométriaux chez la femme, est capable de prévenir la dégradation de YAP et ainsi contribue à la prolifération desdites cellules tumorales (C. He et al., 2019; Chunbo He et al., 2015). Étonnamment, l'accumulation cytoplasmique de YAP peut aussi être associée à un mauvais pronostic dans le cas de certains cancers cervicaux, dont les carcinomes spino-cellulaires (T. Liu et al., 2013).

L'accumulation nucléaire de TAZ dans les cellules tumorales d'adénocarcinome endométrioïdes utérins humains est associée à un pronostic défavorable (M. Zhan et al., 2016).

1.6.7.2 Endométriose

Pour une description de la maladie, voir 1.4.7.2. Il a été démontré que l'expression de YAP et p-YAP était augmentée et diminuée respectivement dans le tissu humain issue de lésions d'endométriose. L'inactivation de *Yap* dans un modèle *in vitro* d'endométriose était aussi associée à une augmentation de l'apoptose et une diminution de la prolifération, alors que le phénomène opposé était observé lors de surexpression de *Yap*, suggérant son implication dans la pathogenèse de la maladie. Des analyses subséquentes à l'aide d'un modèle *in vivo*

d'endométriose chez des souris nues ont confirmé le rôle de *Yap* dans la prolifération de ces lésions (Y. Song et al., 2016). Son accumulation nucléaire permettrait aussi de diminuer l'autophagie en inhibant la voie mTOR et favorisant la survie des cellules endométriosique (T. Pei et al., 2019). L'utilisation de vertéporfine permet de contrôler le phénomène prolifératif associé à *Yap* et ainsi diminuer la taille des lésions observées dans des modèles murins (S. C. Lin et al., 2017; Y. Song et al., 2016).

La cavité péritonéale est un milieu pauvre en oxygène. Lors d'endométriose, le tissu endométrial doit survivre à un milieu hypoxique pour croître. Des analyses CHIP-qPCR effectuées sur des cellules endométriales sous hypoxie ont démontré que la protéine hypoxique HIF-1 α était capable de réprimer la protéine LATS1. L'absence de LATS1 favorise l'accumulation nucléaire de YAP. Ce dernier serait donc un régulateur essentiel expliquant la survie du tissu endométrial en hypoxie lors d'endométriose (S. C. Lin et al., 2017).

1.7 COORDINATIONS POTENTIELLES DES VOIES WNT ET HIPPO DANS LE DÉVELOPPEMENT ET LA FONCTION NORMALE DE L'UTÉRUS ET LE DÉVELOPPEMENT DE PATHOLOGIES UTÉRINES (PRÉLUDE AU PROJET)

Par souci d'efficacité, plusieurs protéines peuvent interagir avec des composantes de voies de signalisations alternatives, de façon synergique ou inhibitrice, dans le but de maintenir l'étroit équilibre nécessaire pour le maintien de la survie cellulaire. Cela permet de décupler les fonctions cellulaires à partir d'un nombre restreint de protéines. Dans cette section, un regard attentif sera porté sur les interactions possibles entre les voies Wnt et Hippo et leur possible relation avec d'autres voies impliquées dans le développement et la fonction de l'utérus ainsi que la pathogenèse de processus pathologiques.

1.7.1 Les voies Wnt et Hippo peuvent-elles interagir et contribuer au développement et à la fonction de l'utérus ?

De nombreuses évidences suggèrent des interactions tangibles entre les voies Wnt et Hippo. L'une des premières contributions à cette question a été rapportée par Varelas et al. Ces derniers ont démontré dans un modèle *in vitro* que TAZ était capable de se lier à la protéine DVL afin de prévenir sa phosphorylation et ainsi inhiber l'activité de la voie Wnt (Varelas et al., 2010) (Figure 10). D'un point de vue mécanistique, cela suggère que la voie Hippo est activée et favorise la phosphorylation de TAZ. Il y a ainsi rétention cytoplasmique de TAZ, ce qui permet donc à ce dernier d'entrer en contact avec DVL pour inhiber sa phosphorylation et limiter l'activité des WNTs. Dans les deux cas, cela se résume en l'absence de transcription des gènes cibles de chacune des voies et donc un résultat similaire (tel que l'absence de prolifération cellulaire). Dans un modèle *in vivo* (invalidation de *Taz* par piégeage de gènes (insertion d'une mutation dans le gène via un vecteur)), il a été démontré que l'absence de TAZ résulte en la formation de kystes rénaux similaires à ceux rencontrés dans d'autres modèles où la β -catenin est suractivée. Dans leur modèle, ils ont aussi démontré une accumulation nucléaire de β -catenin dans les cellules associées aux kystes (Varelas et al., 2010).

Cette liaison dépend grandement du contexte biologique, et des effets régulateurs additionnels ont depuis été rapportés avec encore une finalité commune. Il est possible pour YAP et TAZ (lorsque phosphorylés) de se lier directement à la β -catenin dans le cytoplasme. Cela favorise la rétention cytoplasmique de β -catenin et prévient sa translocation nucléaire sans

nécessairement diminuer sa stabilité ou favoriser sa dégradation (Figure 10). Cette liaison est possible grâce à la présence d'un domaine TEAD-BD spécifique de YAP capable de se lier à la région N-terminale de β -catenin (Imajo, Miyatake, Iimura, Miyamoto, & Nishida, 2012). Dans un modèle *in vitro* utilisant des cellules cancéreuses colorectales, l'invalidation de *Yap* résultait conséquemment en l'augmentation de l'expression de gènes cibles de la voie Wnt dont *CD44*, *c-Myc*, *ENC1*, *EphB2*, *Pla2g2a*, *Sox9* et *WISPI* (Imajo et al., 2012).

La régulation de TAZ se trouve aussi influencée par cette liaison. TAZ et β -catenin sont des protéines dont la durée de vie est très courte car facilement dégradées dans le cytoplasme par le même complexe (β -TrCP ubiquitine ligase). La phosphorylation de β -catenin par GSK3 (complexe de destruction) permet la liaison de cette dernière à β -TrCP pour sa dégradation subséquente. La liaison de p-TAZ avec la β -catenin cytoplasmique expose donc TAZ à β -TrCP, résultant aussi en sa dégradation (Azzolin et al., 2012) (Figure 10). Au contraire, si la voie Wnt est activée, la β -catenin est libérée. TAZ est donc libérée et peut s'accumuler au niveau nucléaire avec la β -catenin et réguler des gènes cibles instrumentaux pour la prolifération cellulaire. Cette hypothèse a été poussée encore plus loin, démontrant que p-YAP et p-TAZ pouvaient aller jusqu'à s'intégrer directement dans le complexe de destruction en se liant à Axin1, en compétitionnant avec le co-récepteur LRP6 pour réguler l'activité des WNTs et en participant au recrutement de β -TrCP (Azzolin et al., 2014).

Dans certains contextes, l'accumulation de TAZ peut se faire au niveau nucléaire grâce à la voie Wnt même lorsque la voie Hippo est activée. WNT3a, entre autres, facilite les interactions entre la protéine PP1A et p-TAZ. PP1A est une phosphatase capable de déphosphoryler les sites de p-TAZ participant à sa liaison avec 14-3-3 et sa dégradation subséquente (Figure 10). Ce phénomène a été mis en évidence dans un modèle *in vitro* dans lequel l'exposition de cellules C3H10T1/2 (cellules souches mésenchymateuses murines) à WNT3a contribue à la stabilisation de TAZ via PP1A suivie de sa translocation nucléaire et de l'engagement cellulaire vers un destin ostéogénique (Byun et al., 2014).

Les effets sont aussi pressentis au niveau nucléaire. Par exemple, dans le cœur en développement, à la fois les voies Wnt et Hippo possèdent des gènes cibles similaires, dont les gènes *Sox2*, *Snai2* et *Birc5*. L'invalidation de *Salvador*, et donc de la voie Hippo, chez la souris résulte notamment en anomalies cardiaques (cardiomégalie avec défaut du septum interventriculaire et prolifération des cardiomyocytes) caractérisée par une accumulation

nucléaire de YAP (voie Hippo inactivée) et de la β -catenin (voie Wnt activée). Des analyses ChIP subséquentes ont permis de mettre en évidence des complexes régulateurs communs dans les promoteurs des gènes *Sox2* et *Snai2*, potentialisant les effets transcriptionnels de ces derniers (Heallen et al., 2011). Les gènes *RMRP* et *Irs1* ont aussi été rapportés comme étant des gènes communs exprimés dans divers contextes biologiques (Hwang et al., 2019; J. Park & Jeong, 2015). Cette synergie nucléaire est amplifiée par le fait que *Yap* semble être un gène cible de la voie Wnt. Le complexe nucléaire β -catenin/TCF4 est capable de lier une région amplificatrice du premier intron de *Yap* et stimuler l'expression de ce dernier (Konsavage, Kyler, Rennoll, Jin, & Yochum, 2012).

Les interactions entre ces deux voies sont donc indéniables et ces exemples ne représentent vraisemblablement qu'une infime partie des interactions possibles, dont la majorité est liée à la voie Wnt canonique. Des évidences récentes suggèrent des interactions notables avec les voies alternatives (non-canoniques) de la voie Wnt pour réguler divers autres facteurs, dont la différenciation ostéogénique, la migration cellulaire et même l'inhibition de la voie Wnt canonique (H. W. Park et al., 2015). Cette éventualité ouvre la porte à de nombreuses possibilités contribuant potentiellement au développement de l'utérus, bien que cette hypothèse n'a pu être démontrée.

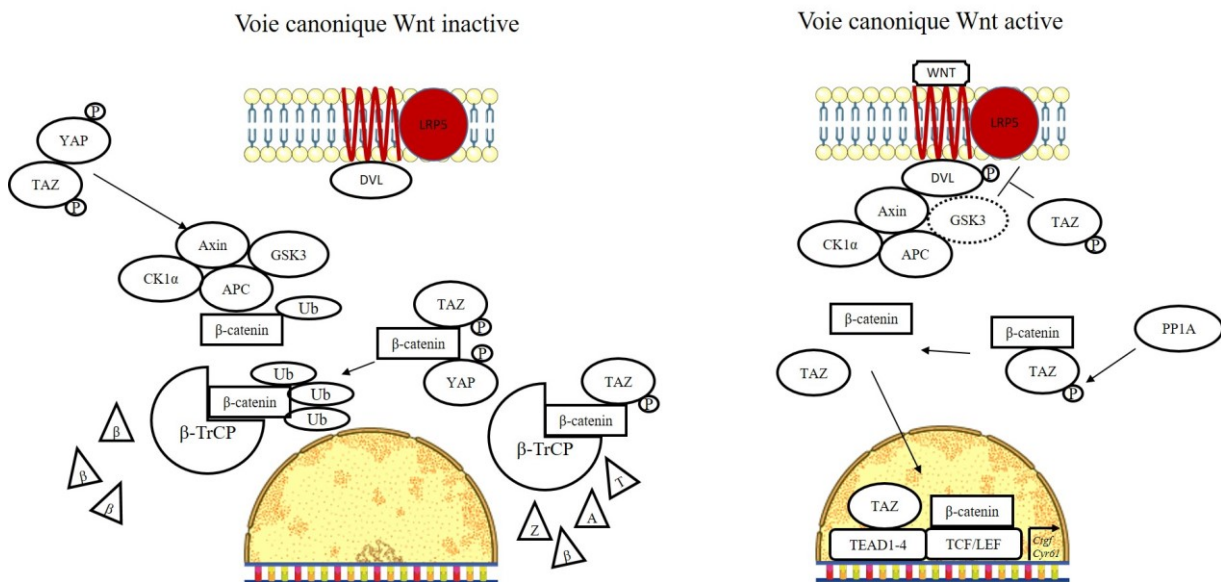


Figure 10. Interactions entre les voies Wnt et Hippo

Certaines composantes de la figure (noyau, ADN, membrane cytoplasmique) sont issues de SMART service medical art (licence commune)

1.7.2 Quelle pourrait être l'implication de ces interactions dans le développement de processus pathologiques utérins ?

Plusieurs maladies utérines, dont l'implication individuelle des voies de signalisation Wnt ou Hippo ont été rapportés, sont décrites dans les sections précédentes. Toutefois, il n'existe pas d'évidences concrètes de l'interaction de ces voies dans la pathogénie de ces maladies malgré la similitude notée dans certaines analyses. Les interactions potentielles demeurent hypothétiques pour ces maladies. Cette section s'attardera sur l'un de ces processus pouvant être important pour l'utérus ; la fibrose.

1.7.2.1 Qu'est-ce que la fibrose ?

La fibrose est un processus réparateur observé lors de lésions chroniques et lorsque les tissus affectés ne possèdent plus la capacité de se régénérer adéquatement. Il s'agit ainsi d'un tissu cicatriciel, caractérisé par une accumulation excessive de collagène, pouvant résulter en une perte de fonction d'un organe et se révéler néfaste pour la santé (Wynn, 2008).

Le processus est essentiellement mis en œuvre par les fibroblastes accompagnés de divers collaborateurs, dont les péricytes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales. Une multitude de ces cellules ainsi que différentes cellules mésenchymales progénitrices ont la capacité de se différencier en myofibroblastes sous diverses contraintes chimiques (TGF- β) et biomécaniques (rigidité de la matrice extracellulaire) (Hinz et al., 2007; Piersma, Bank, & Boersema, 2015). Il s'agit de cellules essentielles pour le processus de guérison et de fibrose car elles acquièrent des caractéristiques contractiles (α -SMA) et sécrétoires (matrice extracellulaire). Elles attribuent au tissu cicatriciel l'élasticité nécessaire pour effectuer la contraction tissulaire, alors que les sécrétions y étant associées sont des composantes essentielles de la matrice extracellulaire (Piersma et al., 2015). La quantité de myofibroblastes observée durant ce processus dépend grandement de la demande cellulaire requise pour la réparation, et souvent corrélée avec le degré de sévérité de l'inflammation chronique. Lorsque le tissu cicatriciel est mature (processus de remodelage/guérison terminé), la demande en myofibroblastes diminue et leur nombre diminue par apoptose (Desmouliere, Redard, Darby, & Gabbiani, 1995). Il arrive, dans certains contextes, que l'inflammation chronique persistante maintienne la survie et l'activité des myofibroblastes. La quantité de collagène sécrétée par les

myofibroblastes dans cette situation surpasse la capacité de dégradation normale du collagène en excès, résultant ainsi en fibrose pathologique (Wynn, 2008).

1.7.2.2 Quelle est l'implication de la fibrose dans les maladies utérines ?

La fibrose est une composante récurrente, primaire ou secondaire, de plusieurs maladies souvent d'origine inflammatoire et pouvant avoir lieu dans l'utérus.

Il existe, entre autres, une condition caractérisée par des adhérences intrautérines dues à de la fibrose endométriale. Les causes pouvant mener à ces adhérences sont nombreuses, mais ont souvent comme évènement commun le bris de la membrane basale endométriale avec inflammation subséquente (Deans & Abbott, 2010).

La fibrose est aussi une composante fréquemment observée dans diverses lésions tumorales bénignes et cancers utérins. Les léiomyomes sont notamment caractérisés par une accumulation excessive de tissu fibreux (Norian et al., 2009; E. A. Stewart, Friedman, Peck, & Nowak, 1994). Les lésions endométriotiques sont aussi associées à une quantité accrue de tissu fibreux (Vigano et al., 2018). L'environnement inflammatoire associé à l'endométriose permet notamment à diverses cellules de s'y différencier en myofibroblastes et contribuer à la fibrose notée dans ces lésions (Q. Zhang, Duan, Liu, & Guo, 2016).

Il est important de rappeler que les voies Wnt et Hippo ont chacune été impliquées, à divers degrés, dans la pathogenèse de plusieurs de ces maladies.

1.7.2.3 Les voies Wnt, Hippo et TGF- β sont reconnues pour réguler conjointement la fibrose

La littérature scientifique récente met en évidence la complexité des interactions pouvant avoir lieu de concert entre les voies Wnt, Hippo et TGF- β pour la régulation de processus fibrotiques (Figure 11) (Piersma et al., 2015). La famille TGF- β est composée d'une multitude de protéines agissant principalement comme des facteurs de croissance. De par leurs effets, ils régulent divers processus similaires à ceux décrits pour les voies Wnt et Hippo (Piersma et al., 2015). Selon le contexte biologique, ces trois voies de signalisation régulent avec minutie la fibrose, soit en augmentant l'activité transcriptionnelle de gènes cibles communs ou encore en restreignant le potentiel perturbateur pouvant être associé à une surexpression d'une des voies. Toutefois, les évidences notables d'accumulation à la fois de β -catenin, YAP, TAZ et SMADs

dans le noyau des cellules de tissu fibroblastique suggère fortement une synergie commune (Lam & Gottardi, 2011; F. Liu et al., 2015; Venkatesan, Pini, & Ludwig, 2004).

Au niveau cytoplasmique, YAP est capable de se lier à SMAD7, un inhibiteur de la voie TGF- β , conférant à ce dernier une affinité accrue pour son récepteur et permettant ainsi d'inhiber la voie TGF- β (Ferrigno et al., 2002). SMAD7 est aussi capable d'inhiber la voie Wnt en interagissant avec la β -catenin et favorisant sa dégradation via le processus d'ubiquitination (Han et al., 2006). Pour répliquer, la protéine Axin, issue de la voie Wnt, peut aussi se lier avec SMAD7 pour, à son tour, permettre la dégradation de SMAD7 et donc potentialiser l'effet de la voie TGF- β (W. Liu et al., 2006). TAZ, pour sa part, est capable d'interagir avec les complexes SMAD2/3/4, des régulateurs et/ou coactivateurs de la voie TGF- β , selon un gradient de concentration. À de faibles concentrations, cette liaison favorise l'accumulation nucléaire des SMADs et ainsi leur activité transcriptionnelle. À de fortes doses, TAZ semble favoriser la rétention cytoplasmique de ces complexes (Varelas et al., 2008).

Au niveau nucléaire, YAP peut former un complexe avec SMAD3 et TEAD afin de favoriser l'expression de gènes cibles communs, dont *Ctgf*, un gène clé dans la différenciation et l'activation des myofibroblastes (Fujii et al., 2012).

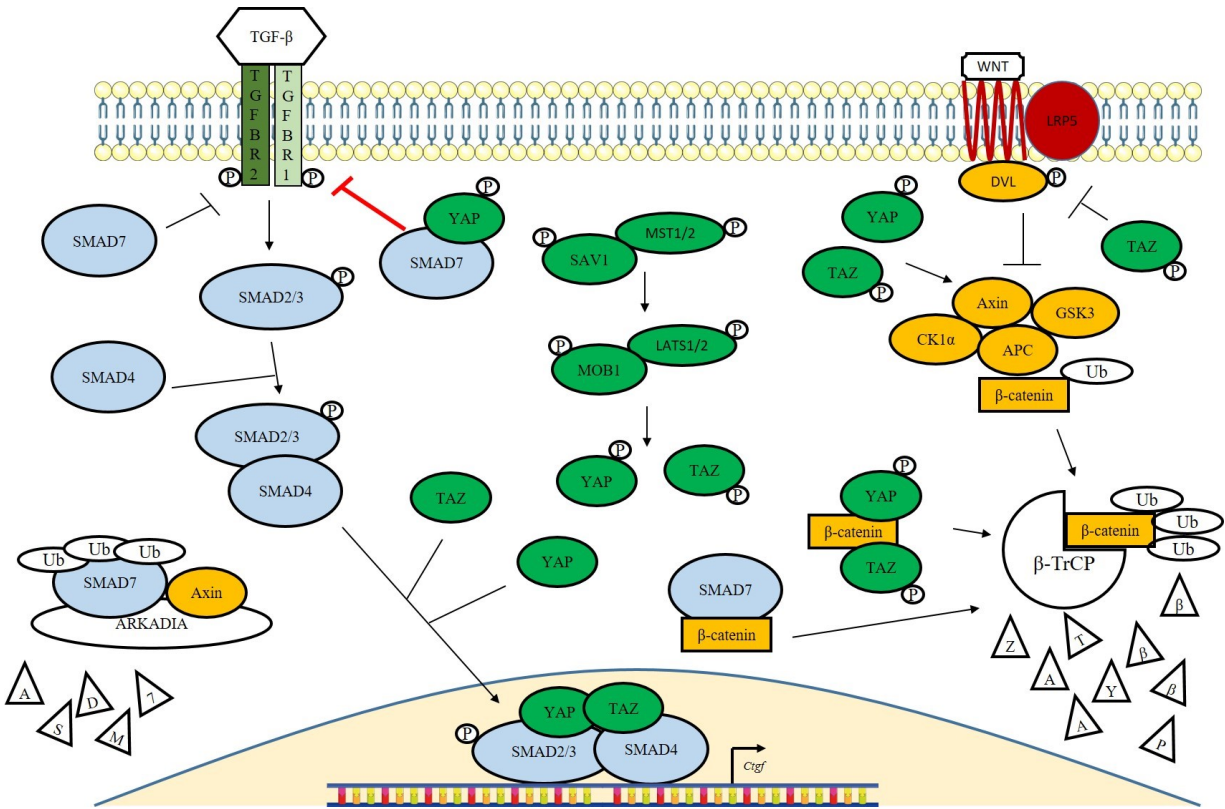


Figure 11. Interactions entre les voies Wnt, Hippo et TGF- β dans le contexte de la fibrose.

Inspirée par Piersma B et al (2015). Vert=composantes de la voie Hippo.

Orange=composantes de la voie Wnt. Bleu=composantes de la voie TGF- β .

Certaines composantes de la figure (ADN, membrane cytoplasmique) sont issues de SMART service medical art (licence commune)

1.7.3 L'invalidation conditionnelle de gènes clés de ces voies permettrait-elle de répondre à ces questions ?

Les voies Wnt et Hippo ont été étudiées via l'utilisation de modèles murins. De ces modèles, plusieurs points clés peuvent être retenus. Dans le contexte du développement utérin, *Wnt4*, *Wnt5a* et *Wnt7a* sont largement représentés. *Wnt4* et *Wnt5a* sont particulièrement intéressants car ils sont exprimés dans des intervalles superposés et exercent des rôles similaires. Cela suggère une redondance fonctionnelle.

Pour la voie Hippo, l'activité transcriptionnelle de YAP et TAZ est essentielle durant l'embryogenèse. Les études immunohistochimiques ont aussi montré leur présence dans les tissus utérins adultes. Il est donc concevable de penser que leur activité soit aussi présente dans

les canaux de Müller durant l'embryogenèse. *Lats1* et *Lats2* seraient donc des gènes d'intérêt clés dont l'invalidation favoriserait l'activité de *Yap* et *Taz*.

Communément, à la fois *Wnt4*, *Wnt5a*, *Yap* et *Taz* exercent des rôles similaires dans la régulation de processus physiologiques utérins (déidualisation) et dans la pathogénèse de maladies utérines (endométriose).

En ciblant conjointement *Wnt4* et *Wnt5a* dans les canaux de Müller (*Amhr2^{cre}*), cela permettrait d'établir la possibilité de redondance fonctionnelle dans le développement du tractus reproducteur femelle. En ciblant conjointement *Lats1* et *Lats2* dans les canaux de Müller (*Amhr2^{cre}*), il serait possible d'établir les rôles d'une surexpression de YAP et TAZ dans le développement du tractus reproducteur femelle. Ces cibles sont d'autant plus intéressantes car elles sont des intermédiaires respectifs de leur voie de signalisation. Leur invalidation aura donc un effet mécanistique direct sur les effecteurs de chaque voie (YAP, TAZ, β -catenin). Le potentiel d'interactions possible entre les deux voies en est grandement accrue.

Il est donc opportun de croire que l'invalidation conditionnelle de ces gènes cibles dans les canaux de Müller permettrait de répondre aux interrogations apportées précédemment. Les sections suivantes mettront en perspective les travaux réalisés durant le cadre de mon PhD et qui ont permis d'apporter des éléments de réponse à ces questions.

CHAPITRE 2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

2.1 HYPOTHÈSES

Les preuves scientifiques factuelles confirment l'implication de la voie Wnt dans le développement du tractus reproducteur ainsi que les interactions de cette voie avec la voie Hippo. De ce constat, deux hypothèses clés seront examinées dans le cadre de ce projet.

1) Les protéines Wnt4 et Wnt5a, ayant une expression spatiotemporelle conjointe dans les canaux de Müller et effectuant des rôles similaires-

2) Les protéines Lats1 et Lats2, ayant des rôles régulateurs à l'égard des effecteurs de la voie Hippo (Yap et Taz) potentiellement influencées par la voie Wnt-
-effectuent des rôles redondants dans le développement des canaux de Müller et sont impliqués dans la pathogénèse de maladies utérines (dont possiblement la fibrose).

2.2 OBJECTIFS

L'évaluation de ces hypothèses se fera via deux projets aux objectifs communs :

Projet 1 : Évaluer les rôles conjoints de *Wnt4* et *Wnt5a*. (Chapitre 3)

- 1) Effectuer une caractérisation phénotypique et moléculaire de souris avec une invalidation conditionnelle de *Wnt4* (cko simple), *Wnt5a* (cko simple) ou conjointe (cko double) à l'aide du modèle *Amhr2^{cre}* ciblant le mésenchyme de Müller.
 - a. Établir les rôles de chacun dans le développement des canaux de Müller.
 - b. Établir les rôles de chacun dans la physiologie utérine adulte, advenant le développement normal de l'utérus.
 - c. Évaluer leur implication dans le développement de pathologies utérines.
 - d. Établir de possibles interactions avec la voie Hippo dans le développement et la fonction du tractus reproducteur femelle.

Projet 2 : Évaluer les rôles conjoints de *Lats1* et *Lats2*. (Chapitre 4)

- 1) Effectuer une caractérisation phénotypique et moléculaire de souris avec une invalidation conditionnelle de *Lats1* (cko simple), *Lats2* (cko simple) ou conjointe (cko double) à l'aide du modèle *Amhr2^{cre}* ciblant le mésenchyme de Müller.
 - a. Établir les rôles de chacun dans le développement des canaux de Müller.
 - b. Établir les rôles de chacun dans la physiologie utérine adulte, advenant le développement normal de l'utérus.
 - c. Évaluer leur implication dans le développement de pathologies utérines.
 - d. Établir de possibles interactions avec la voie Wnt dans le développement et la fonction du tractus reproducteur femelle.

CHAPITRE 3. ARTICLE 1

Targeted ablation of *Wnt4* and *Wnt5a* in Müllerian duct mesenchyme impedes endometrial gland development and causes partial Müllerian agenesis

Guillaume St-Jean¹, Alexandre Boyer¹, Gustavo Zamberlam¹, Philippe Godin¹, Marilène Paquet² and Derek Boerboom^{1*}

¹Département de Biomédecine Vétérinaire and ²Département de Pathologie et de Microbiologie, Université de Montréal, Québec, Canada

*To whom correspondence should be addressed at: Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada. Tel: 450-773-8521; Fax: 450-778-8103; Email: derek.boerboom@umontreal.ca

Keywords: Agenesis, Müllerian duct, Uterine glands, Decidualization, WNT

Publié dans : *Biology of reproduction* en date de Janvier 2019, PMID: 30010727

<https://academic.oup.com/biolreprod/article/100/1/49/5053795>

3.1 ABSTRACT

Wnt4 and *Wnt5a* have well-established roles in the embryonic development of the female reproductive tract, as well as in implantation, decidualization and ovarian function in adult mice. Although these roles appear to overlap, whether *Wnt5a* and *Wnt4* are functionally redundant in these tissues has not been determined. Here, we addressed this by concomitantly inactivating *Wnt4* and *Wnt5a* in the Müllerian mesenchyme and in ovarian granulosa cells by crossing mice bearing floxed alleles to the *Amhr2^{cre}* strain. Whereas fertility was reduced by ~50% in *Wnt4^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}* and *Wnt5a^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}* females, *Wnt4^{flox/flox};Wnt5a^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}* mice were either nearly or completely sterile. Loss of fertility was not due to an ovarian defect, as serum ovarian hormone levels, follicle counts and ovulation rates were comparable to controls. Conversely, the uterus was abnormal in *Wnt4^{flox/flox};Wnt5a^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}* mice, with thin myometrial and stromal layers, frequent fibrosis and a >90% reduction in numbers of uterine glands, suggesting redundant or additive roles of *Wnt4* and *Wnt5a* in uterine adenogenesis. Loss of fertility in *Wnt4^{flox/flox};Wnt5a^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}* mice was attributed to defects in decidualization, implantation and placental development, the severity of which were proportional to the extent of gland loss. Furthermore, a third of *Wnt4^{flox/flox};Wnt5a^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}* females had a partial agenesis of Müllerian duct-derived structures (anterior vagina and cervix, or a partial or complete uterine horn), but with normal oviducts and ovaries. Together, our results suggest that *Wnt4* and *Wnt5a* play redundant roles in the development of the female reproductive tract, and may provide insight into the etiology of certain cases of Müllerian agenesis in women.

3.2 INTRODUCTION

The WNTs are a family of 19 secreted glycoprotein signaling molecules that play important roles during embryonic development by regulating processes such as proliferation, apoptosis and differentiation in a variety of tissues. Among these tissues are the Müllerian ducts, which are paired structures that form laterally to the mesonephric ducts and which give rise to the oviducts, uterus, uterine cervix and the anterior part of the vagina (Robboy, Kurita, Baskin, & Cunha, 2017). The first report of role for WNT signaling in Müllerian development was by Vainio *et al.*, who showed that female *Wnt4*-null mice have no Müllerian structures present at birth (Vainio *et al.*, 1999). A subsequent study employed cell fate mapping and neutralizing antibodies to show that *Wnt4* is required for the invagination and elongation of the Müllerian duct (Prunskaitė-Hyyryläinen *et al.*, 2016). The same study showed that mice with hypomorphic *Wnt4* alleles had abnormal oviducts and myometrium, and an absence of endometrial glands (Prunskaitė-Hyyryläinen *et al.*, 2016). Reduced numbers of endometrial glands were also observed in a conditional knockout model in which *Wnt4* was inactivated using the *Pgr*^{tm2(cre)^{Lyd} strain, which drives Cre expression in the uterine luminal and glandular epithelium, stroma and myometrium (Franco *et al.*, 2011). The latter mice also had a stratified uterine luminal epithelial cell layer, and showed defects in implantation and decidualization, as well as markedly reduced fertility (Franco *et al.*, 2011). Importantly, mutations in the *WNT4* gene have also been identified in several women with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome (Biason-Lauber *et al.*, 2007; Biason-Lauber *et al.*, 2004; Philibert *et al.*, 2011; Philibert *et al.*, 2008), which is characterized by a congenital absence of the upper vagina, cervix and uterus (Fontana, Gentilin, Fedele, Gervasini, & Miozzo, 2017). Together, the above-mentioned studies indicate that *Wnt4* is required for several aspects of the development of the female reproductive tract, as well for its normal functioning during adulthood.}

In addition to *Wnt4*, *Wnt5a* has also been implicated in the development and function of the female reproductive tract. *Wnt5a*-null mice are characterized by short, coiled uterine horns, and lack both the cervix and vagina (Mericskay *et al.*, 2004). As *Wnt5a*-null mice die perinatally, Mericskay *et al.* used grafting techniques to show that *Wnt5a* expression in the uterine stroma is required for endometrial gland formation (Mericskay *et al.*, 2004). More recently, a *Wnt5a* conditional knockout model using the *Pgr*^{tm2(cre)^{Lyd} strain was used to show that *Wnt5a* is required for normal implantation, decidualization and female fertility (Cha *et al.*,}

2014). Furthermore, recombinant WNT5a was shown to be able to rescue a uterine stromal cell proliferation defect in mice with a conditional deletion of porcupine (*Porcn*), a gene involved in WNT secretion (Farah et al., 2017b).

Interestingly, the physiological roles of *Wnt4* and *Wnt5a* also appear to overlap in the ovary. Vainio *et al.* initially showed that oocytes become depleted in the ovaries of *Wnt4*-null in the days prior to birth (Vainio et al., 1999). In a follow-up study, it was shown that *Wnt4* expression in ovarian somatic cells is required for the maintenance of germ cell cysts and normal patterns of gene expression in oocytes (Naillat et al., 2010). The same study showed that, whereas 20% of oocytes in *Wnt4*-null mice were able to initiate meiosis, entry into meiosis was completely inhibited in *Wnt4/Wnt5a* double knockouts, suggesting some level of functional redundancy between the two genes (Naillat et al., 2010). In the postnatal ovary, the conditional inactivation of *Wnt4* in follicular granulosa cells was shown to compromise antral follicle development, cell polarity and female fertility (Boyer et al., 2010; Prunskaitė-Hyyryläinen et al., 2014). Similarly, conditional inactivation of *Wnt5a* in granulosa cells resulted in female subfertility caused by increased antral follicle atresia and decreased rates of ovulation (Abedini et al., 2016).

Wnt4 and *Wnt5a* therefore play critical roles in the development and function of the ovaries and uterus. The degree of overlap between these roles led us to hypothesize that *Wnt4* and *Wnt5a* function in a redundant manner, at least in some contexts. To test this hypothesis, we generated *Wnt4^{flox/flox};Wnt5a^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}* mice to inactivate both genes concomitantly in the Müllerian mesenchyme and in ovarian granulosa cells, and assessed their fertility, follicular development and uterine development and function. Although ovarian function was not compromised in the double conditional knockout model, endometrial gland development, decidualization and implantation were much more severely affected than when *Wnt4* and *Wnt5a* were inactivated individually. Furthermore, many *Wnt4^{flox/flox};Wnt5a^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}* mice had a partial agenesis of Müllerian duct-derived structures. Our data therefore suggest that *Wnt4* and *Wnt5a* play redundant or additive roles in endometrial adenogenesis and in the development of the female reproductive tract.

3.3 MATERIALS AND METHODS

Animal models and fertility trials

The *Wnt4*^{tm1.1Boer} (referred to herein as *Wnt4*^{flox}) (Boyer et al., 2010), *Wnt5a*^{tm1.1Homy} (referred to herein as *Wnt5a*^{flox}) (Abedini et al., 2016) and *Amhr2*^{tm3(cre)Bhr} (referred to herein as *Amhr2*^{cre}) (Jorgez, Klysiak, Jamin, Behringer, & Matzuk, 2004) strains were crossed so as to obtain the *Wnt4*, *Wnt5a* and *Wnt4/Wnt5a* single- and double conditional knockout genotypes described in the text. Genotyping analyses were done by PCR on DNA obtained from tail biopsies as previously described (Abedini et al., 2016; Boyer et al., 2010). To assess fertility in *Wnt4*^{flox/flox}; *Wnt5a*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice, 8 week-old females were housed with 8 week-old wild-type males and monitored daily for litters. Litter sizes were recorded at birth. The males were removed after 6 months and the experiment was terminated 22 days later to allow for the birth of a final litter.

Evaluation of the ovaries

To evaluate follicular development, ovaries from 6 week-old and 8 month-old *Wnt4*^{flox/flox}; *Wnt5a*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} (experimental) and *Wnt4*^{flox/flox}; *Wnt5a*^{flox/flox} (control) mice were collected and fixed in formalin. The left ovary from each animal was paraffin-embedded and serial sections were prepared at a thickness of 5µm. Every fifth section was stained with hematoxylin-eosin-phloxine-saffron (HEPS). For each slide, follicles in which the oocyte nucleus was visible were counted, classified according to Pedersen's system, and scored as atretic or healthy as we have described previously (Byskov, 1974; Devine, Payne, McCuskey, & Hoyer, 2000; Myers, Britt, Wreford, Ebling, & Kerr, 2004; Peluso, England-Charlesworth, Bolender, & Steger, 1980). To determine ovulation efficiency, eight 10 week-old female mice of the experimental and control genotypes were housed with wild-type males and monitored daily for the presence of a vaginal plug. Females were euthanized the morning on which a plug was observed, and the ovaries were carefully dissected along with the oviducts and placed in sterile saline solution. Cumulus-oocyte complexes were released by tearing open the ampullae with forceps and were counted under a dissection microscope.

Evaluation of the uterus

Uteri from mice of different ages were collected, fixed in formalin and paraffin-embedded. Sections were prepared at a thickness of 5µm and stained either with hematoxylin and eosin (H&E), hematoxylin-eosin-phloxine-saffron (HEPS), or Picrosirius red. To quantify endometrial glands, glands were counted in transverse sections of uteri from 8 week-old mice (6 animals per genotype, 3-5 transverse sections per animal). To assess the thickness of the myometrial layers, the same sections used for the gland counts were photographed, and measurements taken using ZEN lite 2012 software (Carl Zeiss microscopy GmbH, Toronto, ON, Canada). For each section, the thickness of the longitudinal and circular layers was measured at four randomly-selected points. To evaluate decidualization, implantation and fetal development, 8-10 weeks-old females were housed with age-matched, wild-type males of similar ages. Females were observed every morning for the presence of a vaginal plug, and uteri were collected on different days post-coitum, formalin-fixed, paraffin-embedded and sectioned. Uterine morphology, number of concepti and embryo viability were evaluated based on methods published by Ward et al (Ward, Elmore, & Foley, 2011). For artificial induction of decidualization, female *Wnt4*^{flox/flox}, *Wnt5a*^{flox/flox}, *Amhr2*^{cre/+} and control mice were mated with vasectomized WT males. Three days following the detection of a copulatory plug, the left uterine horn was externalized through an abdominal surgical incision, and 20 µl of sesame oil was injected in the lumen. Decidualization was assessed 2-4 days following the injections.

RT-qPCR analyses

Immature mice (23-26 days old) were treated with eCG (5 IU, IP) 48h prior to isolation of granulosa cells by needle puncture. Cells were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C prior to RNA extraction using the QIAGEN RNeasy mini kit (Qiagen, Montreal, QC, Canada). RNA quantity and quality was assessed using a NanoDrop-1000 spectrophotometer (Thermo-Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada). RNA was reverse-transcribed using the SuperScript Vilo cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Real-time PCR reactions were run using a C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) and Universal SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Primer efficiency curves were generated using serial dilutions of cDNA, and amplification efficiency (E) values were obtained using the slope of the log-linear phase

derived from the formula $E = e^{(1/\text{slope})}$. Only primers with efficiency values between 1.8 and 2.2 were used. The thermal cycling program to amplify transcripts typically 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. To quantify relative gene expression, the cycle threshold (Ct) values for each transcript were compared with that of *Rpl19*, according to the ratio $[R = (E^{Ct_{Rpl19}}/E^{Ct_{\text{target}}})]$. MIQE guidelines were followed throughout. Primer sequences are listed in supplemental table 1.

***In vitro* stromal cell decidualization**

Wnt4^{flox/flox}; *Wnt5a*^{flox/flox} female mice ranging from 8 to 12 weeks of age were injected daily with estradiol (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) (100 ng, SC) for three days prior to endometrial stromal and epithelial cell isolation and culture. All steps of cell purification, culture and *in vitro* decidualization were done essentially as described by De Clercq et al (De Clercq, Hennes, & Vriens, 2017). Freshly-isolated stromal cells were incubated overnight to permit attachment to the cell culture plates, and subsequently infected with Ad-Cre or Ad-eGFP (Vector development laboratory, Baylor College of Medicine, Houston, TX) at an MOI of approximately 50 for 24h. Following washes, stromal cells were co-cultured with epithelial cells grown in ThinCert cell culture inserts (Greiner Bio-One International, Kremsmünster, Austria), so as to maintain the stromal and epithelial cells separate but able to communicate via a semi-permeable membrane. Following medroxyprogesterone/cAMP (Sigma Aldrich) treatment for 48-72h, *Wnt4*, *Wnt5a* and *Prl8a2* mRNA levels were assessed by RT-qPCR as described above.

Steroid hormone measurement

Blood samples were collected by cardiac puncture before euthanasia. Estradiol and progesterone concentrations in serum were measured by ELISA assays by the Ligand Assay and Analysis Core Laboratory of the University of Virginia (Charlottesville, VA).

Immunohistochemistry

Formalin fixed, paraffin-embedded uteri were sectioned at a thickness of 4-5 µm. Following deparaffinization, rehydration and heat-mediated antigen retrieval, WNT4 (ab91226; Abcam, Cambridge, UK) and WNT5a (ab72583; Abcam, Cambridge, UK) antibodies were incubated at 1:1200 and 1:100 dilutions, respectively, overnight at 4°C. Smooth muscle actin

(MU128-UC; Biogenex, Fremont, CA, USA) was incubated at 1:100 for 1 hour at room temperature using the M.O.M. Kit (PK-2200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Detection was performed with the Vectastain Elite ABC kit and the 3,3' diaminobenzidine peroxidase substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Slides were counterstained with hematoxylin prior to mounting.

Statistical analysis

Analyses were performed using Graph Pad Prism 6 software (GraphPad Software, Inc.). All data were subjected to the *F* test to determine the equality of variances. Data were transformed to logarithms if they were not normally distributed. Statistical significance was determined using unpaired Student-t test or ANOVA, with $p < 0.05$ considered significant. Data are presented as means \pm SEM.

3.4 RESULTS

***Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} females are severely subfertile**

Previous studies have shown that both *Wnt4*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} and *Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice are subfertile, apparently due to abnormal follicular development (Abedini et al., 2016; Boyer et al., 2010). To assess the fertility of *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice, 8 week-old females were individually housed with wild-type males for a period of 6 months, during which litter frequency and size were recorded. Of the 6 experimental pairs, two were sterile due to reproductive tract malformations (described below). The remaining females gave few and small litters, with a ~96% decrease in the total number of pups produced ($P < 0.0001$) and a ~75% decrease in average litter size ($P < 0.0001$) compared to controls (Table 1). By comparison, pup production and average litter sizes were both decreased by ~50% in *Wnt4*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} and *Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} females (Abedini et al., 2016; Boyer et al., 2010).

Ovarian function in *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice is nearly normal

As the *Amhr2*^{cre} allele drives Cre expression in granulosa cells mainly from the secondary follicle stage (W. M. Baarends et al., 1995; Klattig, Sierig, Kruspe, Besenbeck, & Englert, 2007) and ovarian defects occur in *Wnt4*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} and *Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice (Abedini et al., 2016; Boyer et al., 2010), we first determined if the ovary contributed to the subfertility phenotype in *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} females. RT-qPCR analyses of *Wnt4* and *Wnt5a* mRNA levels in granulosa cells isolated from immature, eCG-treated mice showed a significant, ~4 fold reduction in *Wnt4* mRNA levels ($P < 0.01$) (Fig. S1). A ~2 fold decrease was observed for *Wnt5a* mRNA levels (Fig. S1), but this was not statistically significant due to high variability between individual mice. Histopathologic examination of the ovaries of juvenile (42 day-old) and adult (56 day- and 8 month-old) mice showed the presence of ectopic granulosa cells trapped between the oocyte plasma membrane and the zona pellucida in ~5% of ovarian follicles, mostly at the primary and secondary stage of development (Fig. 1). The same phenotype was also observed in the ovaries of *Wnt4*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} (but not *Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+}) mice, indicating that it was the consequence of the loss of *Wnt4* specifically. As a previous study had shown defects in granulosa cell polarity in *Wnt4*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice (Prunskaitė-Hyyryläinen et al., 2014), immunofluorescence

analyses of connexin-43, connexin-37 and laminin expression were conducted on ovaries from 56 day-old *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice. However, no differences relative to control ovaries were detected (not shown), and no anomalies in granulosa cell organization or the appearance of the follicular basement membranes were noted.

Due to follicle development defects observed in both *Wnt4*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} and *Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice (Abedini et al., 2016; Boyer et al., 2010), we quantified the follicular reserves in *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} females at 6 weeks (Fig. S2A) and 8 months (Fig. S2B) of age. No statistically significant difference was observed in the relative abundance of primordial, primary, secondary and antral follicles or in follicular atresia between *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} animals and age-matched controls. Likewise, ovulation rates following natural mating in *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice were comparable to controls (Table 2). Finally, progesterone and estradiol were measured in serum in adult mice, and also showed no differences between *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} females and age-matched controls (Fig. 2). Together, these results indicated that ovarian function is nearly normal in *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice, and therefore that the marked fertility decrease observed in these mice was due to an extra-ovarian defect.

Impaired endometrial adenogenesis, decidualization, implantation and placental development in *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice.

Immunohistochemical analyses were done to evaluate the loss of *Wnt4* and *Wnt5a* expression in the uterus of *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice. Results showed markedly reduced WNT4 and WNT5a immunostaining in the myometrium and stromal cells of *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice, whereas staining in epithelial cells was unaffected (Fig. 3A). This result was expected, as the *Amhr2*^{cre} strain drives Cre expression in the Müllerian mesenchyme, which gives rise to the uterine myometrium and stroma (Teixeira et al., 1996; Zhan et al., 2006).

Histopathologic analysis of the uteri of *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice revealed numerous morphological abnormalities. The uteri were reduced in size and had scarce stroma with few or no endometrial glands (Fig. 3B, 4A). Quantitative analyses in 8 week-old mice showed that *Wnt4*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} and *Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice had ~50% average reductions in numbers of uterine glands relative to controls, whereas

Wnt4^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice showed a >90% decrease (Fig. 4B). These results therefore indicate partially redundant or additive roles of *Wnt4* and *Wnt5a* in the development of endometrial glands. In a subset of *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice that showed a complete loss of uterine glands, Picrosirius red staining often revealed moderate to severe stromal fibrosis (Fig. 3C). Furthermore, the thickness of the myometrium appeared reduced in *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice. This was confirmed by morphometric analyses, which showed statistically significant decreases in the thickness of both the longitudinal and circular myometrial layers (Fig. 4C).

To study decidualization in the *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} model, the decidual response was induced artificially by injection of sesame oil in the uterine lumen of pseudopregnant mice. Although a robust decidual response was observed in all control animals (5/5), it was completely absent in *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice (0/3)(Fig. 5A). To further evaluate uterine function, timed matings were conducted and uterine and placental morphology, decidualization and embryo viability were analyzed at different gestational days. At e5.5, half (4/8) of the *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} animals examined showed no evidence of decidualization, and implantation sites were absent. Endometrial glands also appeared to be completely absent in these mice. The remainder of the *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice had implantation sites in numbers comparable to controls, the decidual response appeared normal and, importantly, variable numbers of glands were present within the endometrium. However, in the subset of *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice in which implantation occurred, an increased incidence of embryonic death and resorption was observed at subsequent gestational days. Numbers of viable embryos were decreased by nearly half by e9.5 in *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} relative to controls [4.00±0.986 (n=9) vs 7.40±0.510 (n=5)], and reduced further to 3.13±0.875 (n=8) and 2.20±1.43 (n=5) by e12.5 and e16.5, respectively. Embryonic mortality was associated in most cases with abnormal development of the labyrinth layer of the placenta (Fig. 5B). Together, these results suggest that the loss of fertility in the *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} model was due to the loss of the endometrial glands, with consequent defects in decidualization, implantation and placental development.

***Wnt4* and *Wnt5a* expression in endometrial stromal cells is not acutely required for decidualization**

We next sought to determine if *Wnt4* and *Wnt5a* expression in stromal cells is directly required for the decidual response (i.e., in addition to acting indirectly through stimulation of adenogenesis). To this end, endometrial stromal cells from *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox} mice were placed in culture and infected with an adenovirus to drive Cre expression (Ad-Cre, to inactivate the floxed alleles) or an adenovirus that drives expression of eGFP (Ad-eGFP, control) for 24h. Ad-cre treatment resulted in ≈96% and ≈95% knockdown of *Wnt4* and *Wnt5a* mRNA levels, respectively (Fig. 6A). Following removal of the adenovirus, stromal cells were co-cultured with endometrial epithelial cells (separated via a semi-permeable membrane) and treated or not with medroxyprogesterone and cAMP to induce decidualization over a period of 48-72h. Both the Ad-Cre and Ad-eGFP-treated stromal cells responded to medroxyprogesterone + cAMP with a dramatic increase in decidual prolactin (*Prl8a2*) mRNA levels, indicating that decidualization occurred in both groups (Fig. 6B). This result suggests that *Wnt4* and *Wnt5a* expression in stromal cells is not directly required for the decidual response, and therefore that the decidualization defect observed in *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice can be attributed solely to the effect of *Wnt4/Wnt5a* loss on endometrial gland development.

Partial Müllerian agenesis in a subset of *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice

Approximately one third of *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice were found to have a partial agenesis of the female reproductive tract. The most frequent malformation observed was an apparent incomplete elongation of the lower part of the reproductive tract, characterized by the absence of a vaginal opening (Fig. 7A), agenesis of the anterior vagina and uterine cervix, and uterine horns dilated by an abundant quantity of mucous material (mucometra) (Fig. 7B). The uterus in these mice was mostly well-developed, except for the presence of a dead-end at the caudal extremity that was connected to the external genitalia by a thin membrane (Fig. 7C). Histologically, this membrane was mostly composed of fibrous and adipose tissue, and was accompanied by the urethra extending from the urinary bladder to the urethral process (Fig. 7D). Ovaries and oviducts were normal in these mice.

Partial or complete agenesis of a uterine horn was also observed in several (~10%) *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice. The absent uterine horn was usually replaced by a

long, thin fibrous membrane to which a morphologically normal oviduct and ovary were attached (Fig. 7E). Histologically, this membrane was composed of adipose tissue and smooth muscle reminiscent of the myometrium, but without endometrial stroma or a lumen (Fig. 7F). The identity of the smooth muscle was confirmed by immunohistochemistry using smooth muscle actin as a marker (Fig. 7G, H). In these mice, the contralateral uterine horn, cervix and vagina were usually normal, and several were able to conceive and bring gestations to term.

3.5 DISCUSSION

Genetically modified mouse models have been instrumental in elucidating the biological roles of *Wnt4* and *Wnt5a*. These have notably shown their essential roles in the development of the female reproductive tract, in processes such as decidualization, implantation and gland development in the endometrium, as well as in ovarian follicle development (Abedini et al., 2016; Boyer et al., 2010; Cha et al., 2014; Farah et al., 2017b; Franco et al., 2011; Mericskay et al., 2004). Similarities in the phenotypes obtained through inactivation of *Wnt4* or *Wnt5a* suggest that they are functionally redundant and/or complementary, at least in certain contexts. In this study, we tested this idea by conditionally inactivating *Wnt4* and *Wnt5a* concomitantly in the Müllerian mesenchyme using the *Amhr2^{cre}* strain. The resulting *Wnt4^{flox/flox};Wnt5a^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}* mice had a much more severe reduction in endometrial gland development than when either gene was inactivated individually. Likewise, a Müllerian agenesis phenotype was frequently observed in the *Wnt4^{flox/flox};Wnt5a^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}* model, but did not occur in the single conditional knockouts. We interpret these findings as the first direct evidence that WNT4 and WNT5a act in a redundant manner in the Müllerian mesenchyme to ensure reproductive tract development, and in a partially redundant or additive manner in the uterine stroma to regulate endometrial adenogenesis.

Some insight into the uterine cell type-specific roles of *Wnt4* can be gained by comparing of the phenotypes of mice in which it was conditionally inactivated using either the *Amhr2^{cre}* or *Pgr^{cre}* strain. Although both strains drive Cre expression in the myometrium and uterine stroma, the *Pgr^{cre}* model also drives Cre expression in the luminal and glandular epithelium (Franco et al., 2011), in which *Wnt4* (and *Wnt5a*) are highly expressed. Notably, although *Wnt4^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}* mice have reduced numbers of endometrial glands, they are nearly absent in *Wnt4^{flox/flox};Pgr2^{cre/+}* mice (Franco et al., 2011), indicating that WNT4 of epithelial origin is an important contributor to adenogenesis, and can at least partially offset the loss of stromal WNT4 in the *Wnt4^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}* model. In addition, *Wnt4^{flox/flox};Pgr2^{cre/+}* mice had a stratified uterine luminal epithelial cell layer, containing cells positive for the basal cell marker p63 and the stratified epithelium marker cytokeratin 5 (Franco et al., 2011). These changes were absent in the *Wnt4^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}* and *Wnt4^{flox/flox}; Wnt5a^{flox/flox}; Amhr2^{cre/+}* models, and we did not observe cytokeratin 5-positive epithelial cells within their uteri (not shown). These

results indicate that *Wnt4* expression specifically in the uterine luminal epithelium is required to prevent stratification.

Endometrial glands have been reported to play a major role in implantation and decidualization in mice (Filant & Spencer, 2013). These glands notably produce LIF in response to the nidatory surge of estrogen from the ovary (Bhatt, Brunet, & Stewart, 1991). Implantation and decidualization does not occur in absence of LIF, as shown in LIF knockout mice, as well as in various knockout and conditional knockout mouse models which lack uterine glands (e.g., *Lef1*, *Foxa2*, *Wnt7a*) (J. Cheng, Rosario, Cohen, Hu, & Stewart, 2017; Dunlap et al., 2011; Jeong et al., 2010; C. L. Stewart et al., 1992). Indeed, these processes were never observed in the subset of *Wnt4*^{flox/flox}; *Wnt5a*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice that completely lacked uterine glands, supporting the notion that gland loss was the primary cause of the implantation defect. Interestingly, the latter mice also had varying degrees of uterine fibrosis. Lack of endometrial glands and uterine fibrosis had previously been observed in mice lacking the WNT receptor Frizzled 1 (*Fzd1*), suggesting that it may serve as a physiological receptor for WNT4 and WNT5a. However, only a small proportion of *Fzd1*-null animals exhibited the abnormal uterine phenotype, suggesting that FZD1 is unlikely to be the sole WNT4/5a receptor (Lapointe et al., 2012). Other than driving the development of endometrial glands, Franco et al. have shown that *Wnt4* expression in decidual cells is also required for proper progesterone signaling (Franco et al., 2011). Whether progesterone signaling is altered during decidualization in *Wnt4*^{flox/flox}; *Wnt5a*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice, and whether this contributed to the decidualization/implantation/placental development defects will be grounds for further study. However, our *in vitro* data shows that medroxyprogesterone-induced stromal cell decidualization occurs in absence of *Wnt4/Wnt5a*, suggesting that loss of these genes does not inhibit progesterone signaling to the point that the decidual response is significantly impeded.

Given the established roles of *Wnt4* and *Wnt5a* in ovarian follicle development (Abedini et al., 2016; Boyer et al., 2010; Prunskaitė-Hyyryläinen et al., 2014), ovarian defects were expected in *Wnt4*^{flox/flox}; *Wnt5a*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice. We observed granulosa cells trapped under the zona pellucida in a small subset of follicles, which also occurred in *Wnt4*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice, indicating that it was a consequence of loss WNT4 specifically. This is a novel observation that had not been reported by either group that had previously described the *Wnt4*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} model (Boyer et al., 2010; Prunskaitė-Hyyryläinen et al., 2014).

Although the cause of this was not determined in our study, it could conceivably be related to the granulosa cell polarity defects that occur in *Wnt4*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice (Prunskaitė-Hyyryläinen et al., 2014). As the ectopic granulosa cells were never observed in large follicles, we hypothesize that they provoke atresia at some point during follicle development. Other than this anomaly, we were unable to detect any defects in the ovaries of *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice, including any that had been reported in the *Wnt4*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} or *Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} models (Abedini et al., 2016; Boyer et al., 2010). As the decrease in *Wnt4/Wnt5a* expression in the granulosa cells of *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice was modest relative to what was obtained in the *Wnt4*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} and *Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} models (Abedini et al., 2016; Boyer et al., 2010), the lack of ovarian anomalies was ultimately attributed to poor efficiency of Cre-mediated recombination of the floxed alleles in the double conditional knockout model.

Müllerian abnormalities are common, affecting up to 7% of women (Y. Y. Chan et al., 2011). These range from minor anatomical anomalies to complete aplasia. At the most severe end of the spectrum is Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome, which is characterized by a congenital absence of the uterus, cervix and upper part of the vagina (Morcel, Camborieux, & Guerrier, 2007). In type I MRKH, fallopian tubes are normal. Type II MRKH often features hypoplasia or aplasia of the fallopian tubes, and can be accompanied by additional development defects of the kidney, skeleton, middle ear and heart (Morcel et al., 2007). Hypoplasia/aplasia of the uterine horns can be asymmetric in type II MRKH, leading to the development of a unicornuate uterus (Morcel et al., 2007). The genetics of MRKH syndrome is complex and incompletely understood (Fontana et al., 2017). Several cases of MRKH have been associated with loss-of-function mutations in the *WNT4* gene (Fontana et al., 2017; Philibert et al., 2008; Williams et al., 2017), although abnormal ovarian development and hyperandrogenism also occurs in these patients, leading many authors to consider these cases to be a syndrome distinct from MRKH (Biason-Lauber et al., 2007; Biason-Lauber et al., 2004; Clement-Ziza et al., 2005; Philibert et al., 2011). The Müllerian abnormalities that we have identified in *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mice are strikingly similar to those that occur in MRKH patients, and mimic certain features of both the type I and type II syndromes. The reason(s) for the incomplete penetrance and variability of the Müllerian agenesis phenotype observed in the *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} model are unknown, but may be due to the

differences between animals in the exact timing, localization and extent of Cre-mediated recombination of the floxed *Wnt4* and *Wnt5a* alleles. For instance, extensive recombination in the Müllerian mesenchyme in one of the two Müllerian ducts during early development may lead to agenesis of a single uterine horn, while allowing the rest of the reproductive tract to develop normally. Additional experiments will be required to test this possibility. Nonetheless, our findings support the notion that dysregulated WNT signaling in the Müllerian mesenchyme could be an important factor in the development of MRKH. *Wnt4*^{flox/flox}; *Wnt5a*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice may therefore represent a valuable model for the study of this syndrome.

3.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Ms. Meggie Girard for assistance with mouse colony management and Ms. Nancy Veilleux and Ms. Jacinthe Cardin for assistance with sectioning of processed tissues.

3.7 FUNDING

Canadian Institutes of Health Research Operating Grant MOP-102508 to DB.

3.8 CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None declared.

3.9 REFERENCES

1. 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 J*, *30*(4), 1534-1547. doi:10.1096/fj.15-280313
2. Baarends, W. M., Uilenbroek, J. T., Kramer, P., Hoogerbrugge, J. W., van Leeuwen, E. C., Themmen, A. P., & Grootegoed, J. A. (1995). Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology*, *136*(11), 4951-4962. doi:10.1210/endo.136.11.7588229
3. Bhatt, H., Brunet, L. J., & Stewart, C. L. (1991). Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, *88*(24), 11408-11412.
4. Biason-Lauber, A., De Filippo, G., Konrad, D., Scarano, G., Nazzaro, A., & Schoenle, E. J. (2007). WNT4 deficiency--a clinical phenotype distinct from the classic Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a case report. *Hum Reprod*, *22*(1), 224-229. doi:10.1093/humrep/del360
5. Biason-Lauber, A., Konrad, D., Navratil, F., & Schoenle, E. J. (2004). A WNT4 mutation associated with Mullerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N Engl J Med*, *351*(8), 792-798. doi:10.1056/NEJMoa040533
6. Boyer, A., Lapointe, E., Zheng, X., Cowan, R. G., Li, H., Quirk, S. M., . . . Boerboom, D. (2010). WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility. *FASEB J*, *24*(8), 3010-3025. doi:10.1096/fj.09-145789
7. Byskov, A. G. (1974). Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. *J Reprod Fertil*, *37*(2), 277-285.
8. Cha, J., Bartos, A., Park, C., Sun, X., Li, Y., Cha, S. W., . . . Dey, S. K. (2014). Appropriate crypt formation in the uterus for embryo homing and implantation requires Wnt5a-ROR signaling. *Cell Rep*, *8*(2), 382-392. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.027
9. Chan, Y. Y., Jayaprakasan, K., Zamora, J., Thornton, J. G., Raine-Fenning, N., & Coomarasamy, A. (2011). The prevalence of congenital uterine anomalies in unselected

- and high-risk populations: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 17(6), 761-771. doi:10.1093/humupd/dmr028
10. Cheng, J., Rosario, G., Cohen, T. V., Hu, J., & Stewart, C. L. (2017). Tissue-Specific Ablation of the LIF Receptor in the Murine Uterine Epithelium Results in Implantation Failure. *Endocrinology*, 158(6), 1916-1928. doi:10.1210/en.2017-00103
 11. Clement-Ziza, M., Khen, N., Gonzales, J., Cretolle-Vastel, C., Picard, J. Y., Tullio-Pelet, A., . . . Nihoul-Fekete, C. (2005). Exclusion of WNT4 as a major gene in Rokitansky-Kuster-Hauser anomaly. *Am J Med Genet A*, 137(1), 98-99. doi:10.1002/ajmg.a.30833
 12. De Clercq, K., Hennes, A., & Vriens, J. (2017). Isolation of Mouse Endometrial Epithelial and Stromal Cells for In Vitro Decidualization. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*(121), 55168. doi:10.3791/55168
 13. Devine, P. J., Payne, C. M., McCuskey, M. K., & Hoyer, P. B. (2000). Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol Reprod*, 63(5), 1245-1252.
 14. Dunlap, K. A., Filant, J., Hayashi, K., Rucker, E. B., 3rd, Song, G., Deng, J. M., . . . Spencer, T. E. (2011). Postnatal deletion of *Wnt7a* inhibits uterine gland morphogenesis and compromises adult fertility in mice. *Biol Reprod*, 85(2), 386-396. doi:10.1095/biolreprod.111.091769
 15. Farah, O., Biechele, S., Rossant, J., & Dufort, D. (2017). Porcupine-dependent Wnt signaling controls stromal proliferation and endometrial gland maintenance through the action of distinct WNTs. *Dev Biol*, 422(1), 58-69. doi:10.1016/j.ydbio.2016.11.023
 16. Filant, J., & Spencer, T. E. (2013). Endometrial glands are essential for blastocyst implantation and decidualization in the mouse uterus. *Biol Reprod*, 88(4), 93. doi:10.1095/biolreprod.113.107631
 17. Fontana, L., Gentilin, B., Fedele, L., Gervasini, C., & Miozzo, M. (2017). Genetics of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome. *Clin Genet*, 91(2), 233-246. doi:10.1111/cge.12883
 18. Franco, H. L., Dai, D., Lee, K. Y., Rubel, C. A., Roop, D., Boerboom, D., . . . DeMayo, F. J. (2011). WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse. *FASEB J*, 25(4), 1176-1187. doi:10.1096/fj.10-175349

19. Jeong, J.-W., Kwak, I., Lee, K. Y., Kim, T. H., Large, M. J., Stewart, C. L., . . . DeMayo, F. J. (2010). *Foxa2* Is Essential for Mouse Endometrial Gland Development and Fertility. *Biology of Reproduction*, *83*(3), 396-403. doi:10.1095/biolreprod.109.083154
20. Jorgez, C. J., Klysik, M., Jamin, S. P., Behringer, R. R., & Matzuk, M. M. (2004). Granulosa cell-specific inactivation of follistatin causes female fertility defects. *Mol Endocrinol*, *18*(4), 953-967. doi:10.1210/me.2003-0301
21. Klattig, J., Sierig, R., Kruspe, D., Besenbeck, B., & Englert, C. (2007). Wilms' Tumor Protein Wt1 Is an Activator of the Anti-Müllerian Hormone Receptor Gene *Amhr2*. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(12), 4355-4364. doi:10.1128/MCB.01780-06
22. 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. *Biol Reprod*, *87*(5), 104. doi:10.1095/biolreprod.112.102608
23. Mericskay, M., Kitajewski, J., & Sassoon, D. (2004). *Wnt5a* is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. *Development*, *131*(9), 2061-2072. doi:10.1242/dev.01090
24. Morcel, K., Camborieux, L., & Guerrier, D. (2007). Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome. *Orphanet J Rare Dis*, *2*, 13. doi:10.1186/1750-1172-2-13
25. Myers, M., Britt, K. L., Wreford, N. G. M., Ebling, F. J. P., & Kerr, J. B. (2004). Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction*, *127*(5), 569-580. doi:10.1530/rep.1.00095
26. Naillat, F., Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Pietila, I., Sormunen, R., Jokela, T., Shan, J., & Vainio, S. J. (2010). *Wnt4/5a* signalling coordinates cell adhesion and entry into meiosis during presumptive ovarian follicle development. *Hum Mol Genet*, *19*(8), 1539-1550. doi:10.1093/hmg/ddq027
27. Peluso, J. J., England-Charlesworth, C., Bolender, D. L., & Steger, R. W. (1980). Ultrastructural alterations associated with the initiation of follicular atresia. *Cell Tissue Res*, *211*(1), 105-115.
28. Philibert, P., Biason-Lauber, A., Gueorguieva, I., Stuckens, C., Pienkowski, C., Lebon-Labich, B., . . . Sultan, C. (2011). Molecular analysis of *WNT4* gene in four adolescent girls with müllerian duct abnormality and hyperandrogenism (atypical Mayer-

- Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome). *Fertil Steril*, 95(8), 2683-2686. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.01.152
29. Philibert, P., Biason-Lauber, A., Rouzier, R., Pienkowski, C., Paris, F., Konrad, D., . . . Sultan, C. (2008). Identification and functional analysis of a new WNT4 gene mutation among 28 adolescent girls with primary amenorrhea and mullerian duct abnormalities: a French collaborative study. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(3), 895-900. doi:10.1210/jc.2007-2023
 30. Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Shan, J., Railo, A., Heinonen, K. M., Miinalainen, I., Yan, W., . . . Vainio, S. J. (2014). Wnt4, a pleiotropic signal for controlling cell polarity, basement membrane integrity, and antimullerian hormone expression during oocyte maturation in the female follicle. *FASEB J*, 28(4), 1568-1581. doi:10.1096/fj.13-233247
 31. Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Skovorodkin, I., Xu, Q., Miinalainen, I., Shan, J., & Vainio, S. J. (2016). Wnt4 coordinates directional cell migration and extension of the Mullerian duct essential for ontogenesis of the female reproductive tract. *Hum Mol Genet*, 25(6), 1059-1073. doi:10.1093/hmg/ddv621
 32. Robboy, S. J., Kurita, T., Baskin, L., & Cunha, G. R. (2017). New insights into human female reproductive tract development. *Differentiation*, 97, 9-22. doi:10.1016/j.diff.2017.08.002
 33. Stewart, C. L., Kaspar, P., Brunet, L. J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F., & Abbondanzo, S. J. (1992). Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 359(6390), 76-79. doi:10.1038/359076a0
 34. Teixeira, J., He, W. W., Shah, P. C., Morikawa, N., Lee, M. M., Catlin, E. A., . . . Donahoe, P. K. (1996). Developmental expression of a candidate mullerian inhibiting substance type II receptor. *Endocrinology*, 137(1), 160-165. doi:10.1210/endo.137.1.8536608
 35. Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., & McMahon, A. P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, 397(6718), 405-409. doi:10.1038/17068
 36. Ward, J. M., Elmore, S. A., & Foley, J. F. (2011). Pathology Methods for the Evaluation of Embryonic and Perinatal Developmental Defects and Lethality in Genetically Engineered Mice. *Veterinary Pathology*, 49(1), 71-84. doi:10.1177/0300985811429811

37. Williams, L. S., Demir Eksi, D., Shen, Y., Lossie, A. C., Chorich, L. P., Sullivan, M. E., . . . Layman, L. C. (2017). Genetic analysis of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome in a large cohort of families. *Fertil Steril*, *108*(1), 145-151 e142. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.05.017
38. Zhan, Y., Fujino, A., MacLaughlin, D. T., Manganaro, T. F., Szotek, P. P., Arango, N. A., . . . Donahoe, P. K. (2006). Müllerian inhibiting substance regulates its receptor/SMAD signaling and causes mesenchymal transition of the coelomic epithelial cells early in Müllerian duct regression. *Development*, *133*(12), 2359-2369. doi:10.1242/dev.02383

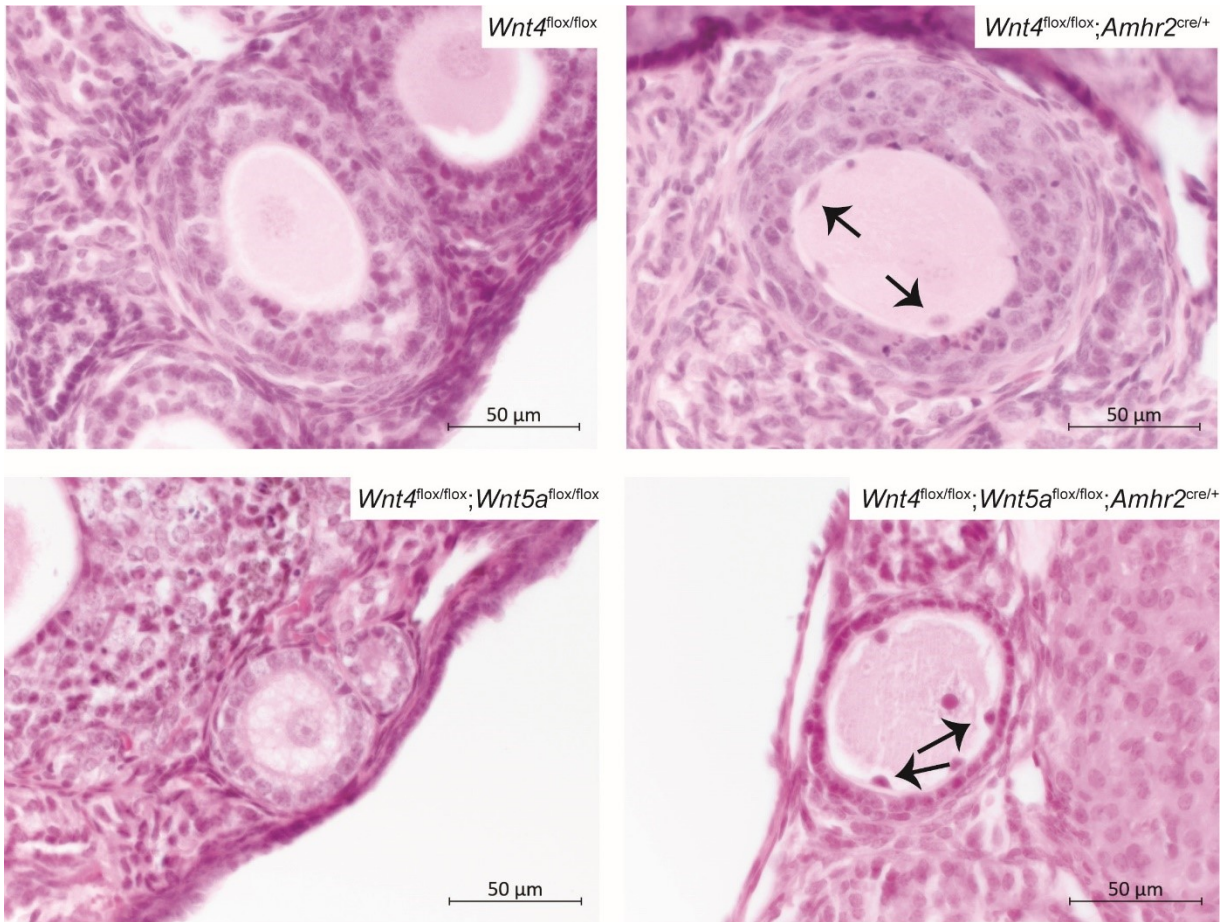


Figure 1. Histopathological examination of the ovaries of six week-old *Wnt4^{flox/flox}; Amhr2^{cre/+}* and *Wnt4^{flox/flox}; Wnt5a^{flox/flox}; Amhr2^{cre/+}* mice.

Photomicrographs show the presence of ectopic granulosa cells located between the oocyte plasma membrane and the zona pellucida (arrows).

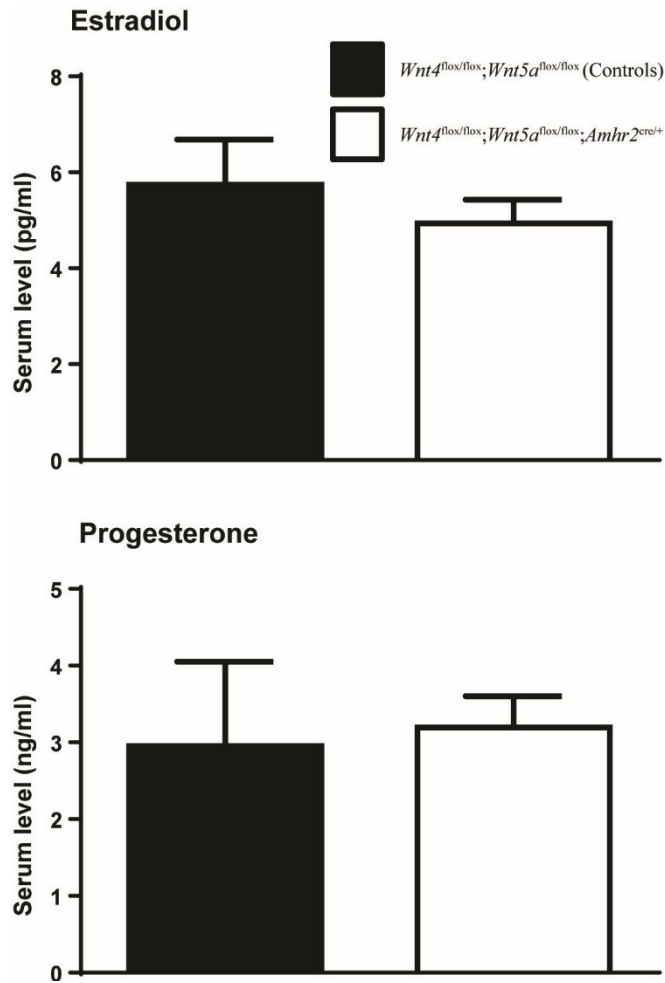


Figure 2. Serum progesterone and estradiol levels in adult $Wnt4^{flox/flox}; Wnt5a^{flox/flox}; Amhr2^{cre/+}$ mice and age-matched controls.

n=6 animals per group, data are expressed as means (columns) \pm SEM (error bars).

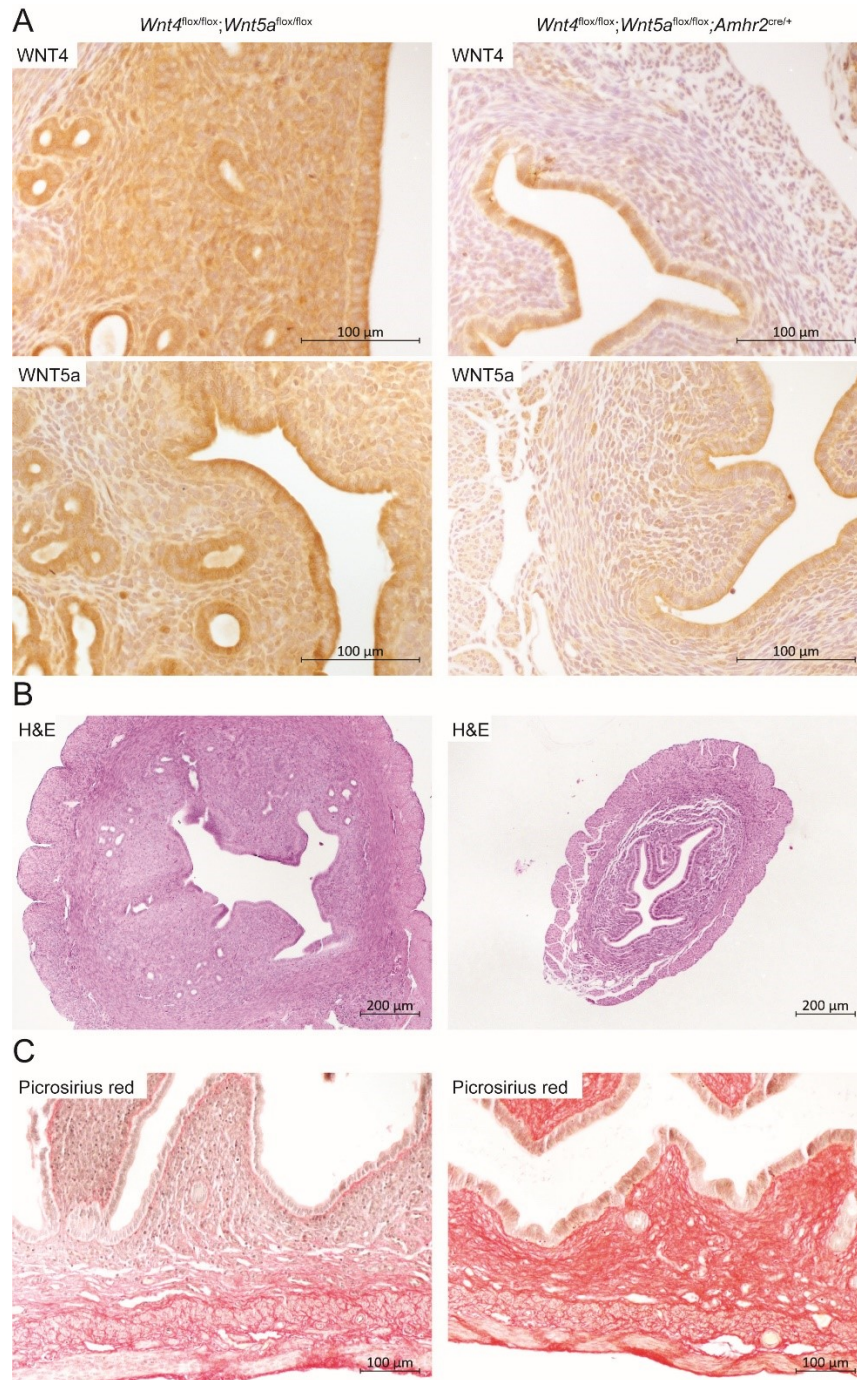


Figure 3. Evaluation of the uteri of 56 day-old *Wnt4*^{flx/flx};*Wnt5a*^{flx/flx};*Amhr2*^{cre/+} mice. (A) Immunostaining for WNT4 and WNT5a. Slides were counterstained with hematoxylin. (B) Hematoxylin and eosin (H&E) stain. (C) Picrosirius red stain. Note the abundance of collagen fibers (red) in the uterine stroma in *Wnt4*^{flx/flx};*Wnt5a*^{flx/flx};*Amhr2*^{cre/+} mice.

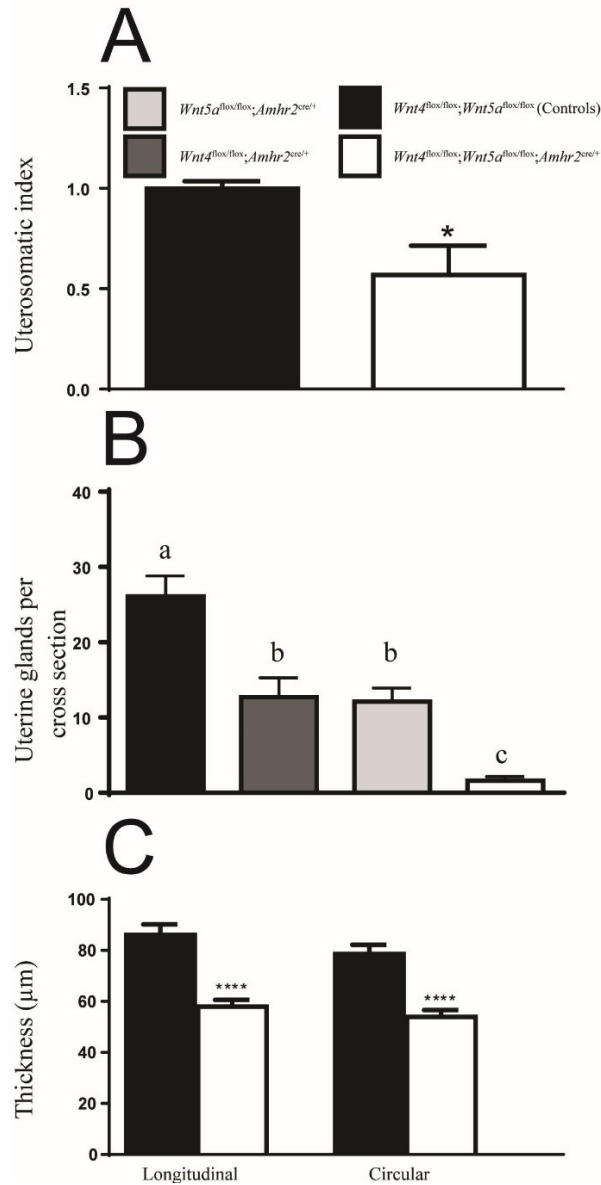


Figure 4. Morphometric analyses of the uteri of *Wnt4^{flx/flx};Wnt5a^{flx/flx};Amhr2^{cre/+}* mice. (A) Evaluation of uterosomatic index (Uterus weight (gr) / Whole body weight (gr) X 100) in 21 day-old mice, n=6 mice per group. (B) Quantitative evaluation of endometrial glands. n=6 mice per group, 3-5 transverse section per uterus. Columns that are not labeled with common letters are significantly different (P<0.05). (C) Morphometric analyses of the myometrium. n=6 mice per group. All data are expressed as means (columns) ± SEM (error bars). Columns labeled with asterisks are significantly different from control (* = P<0.05, **** = P<0.0001).

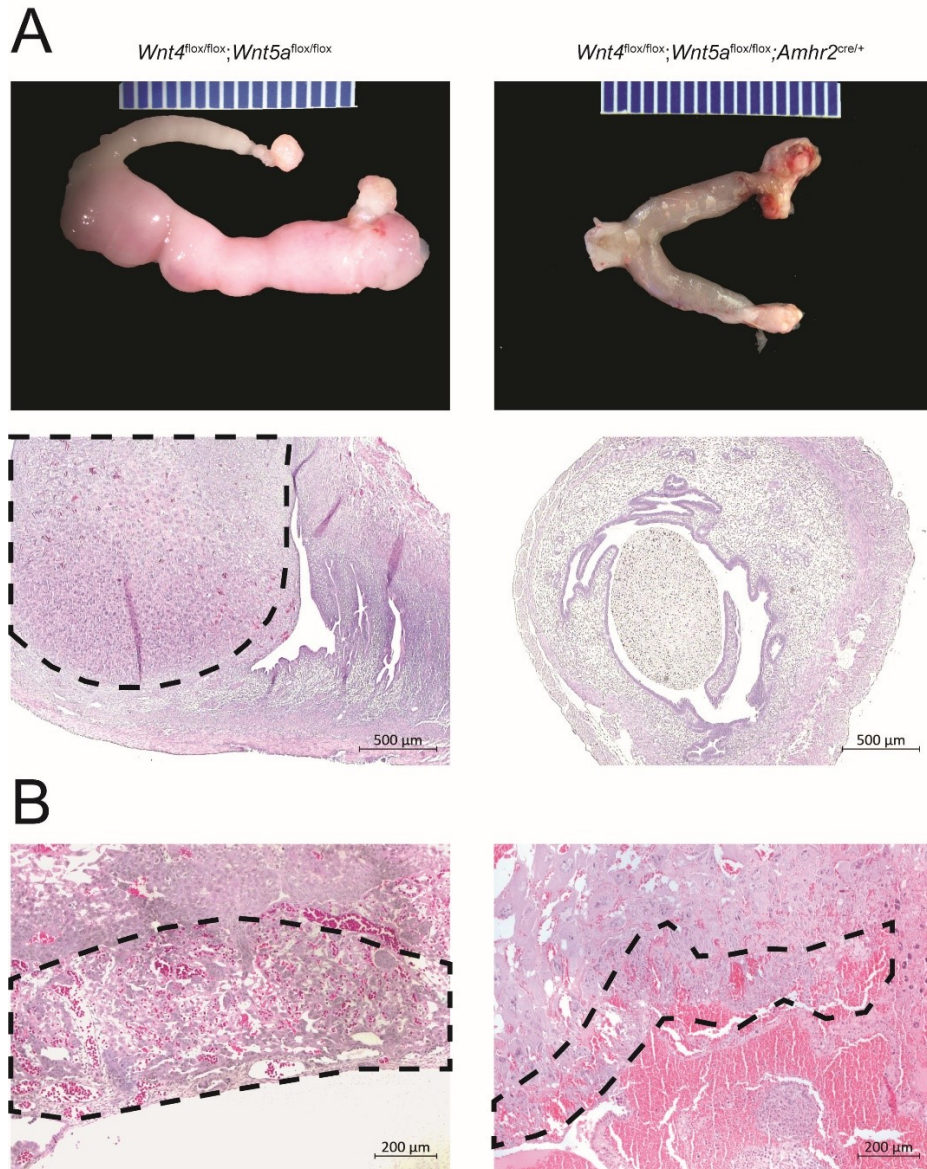


Figure 5. Evaluation of uterine function in $Wnt4^{flox/flox}; Wnt5a^{flox/flox}; Amhr2^{cre/+}$ mice. (A) Macroscopic (upper panels) and histologic (lower panels) images of the uteri of pseudopregnant mice of the indicate genotypes 48h following injection of sesame oil in the lumen of the left uterine horn. The decidual response (enlargement of the injected uterine horn) was absent in the $Wnt4^{flox/flox}; Wnt5a^{flox/flox}; Amhr2^{cre/+}$ uterus, but present in the control. Decidual tissue is circumscribed with a dotted line in the corresponding photomicrograph. Material in the uterine lumen was mostly cellular debris. (B) Placental defects at e12.5. The placental labyrinth is circumscribed with a dotted line. Stain = Hematoxylin-phloxine-saffron (HPS).

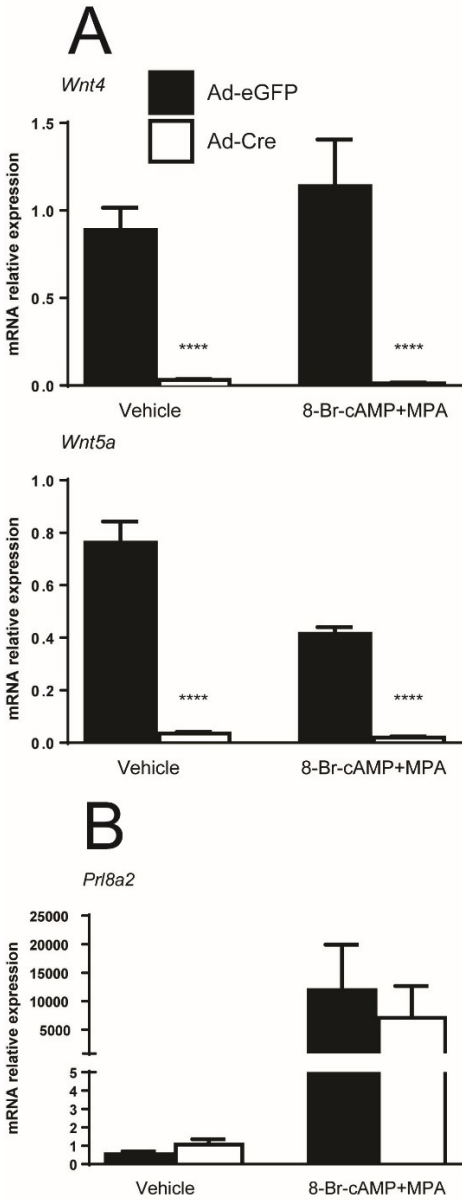


Figure 6. Decidualization of uterine stromal cells *in vitro*.

(A) RT-qPCR analysis of *Wnt4* and *Wnt5a* mRNA levels in cultured uterine stromal cells from *Wnt4*^{flox/flox}; *Wnt5a*^{flox/flox} mice following 24h treatment with Ad-Cre or Ad-eGFP, and 3 days of treatment with cAMP + medroxyprogesterone (or vehicle control). (B) RT-qPCR analysis of decidual prolactin (*Prl8a2*) mRNA levels in the samples described in A. All data are expressed as means (columns) \pm SEM (error bars). Columns labeled with asterisks are statistically significant from controls (**** = $P < 0.0001$).

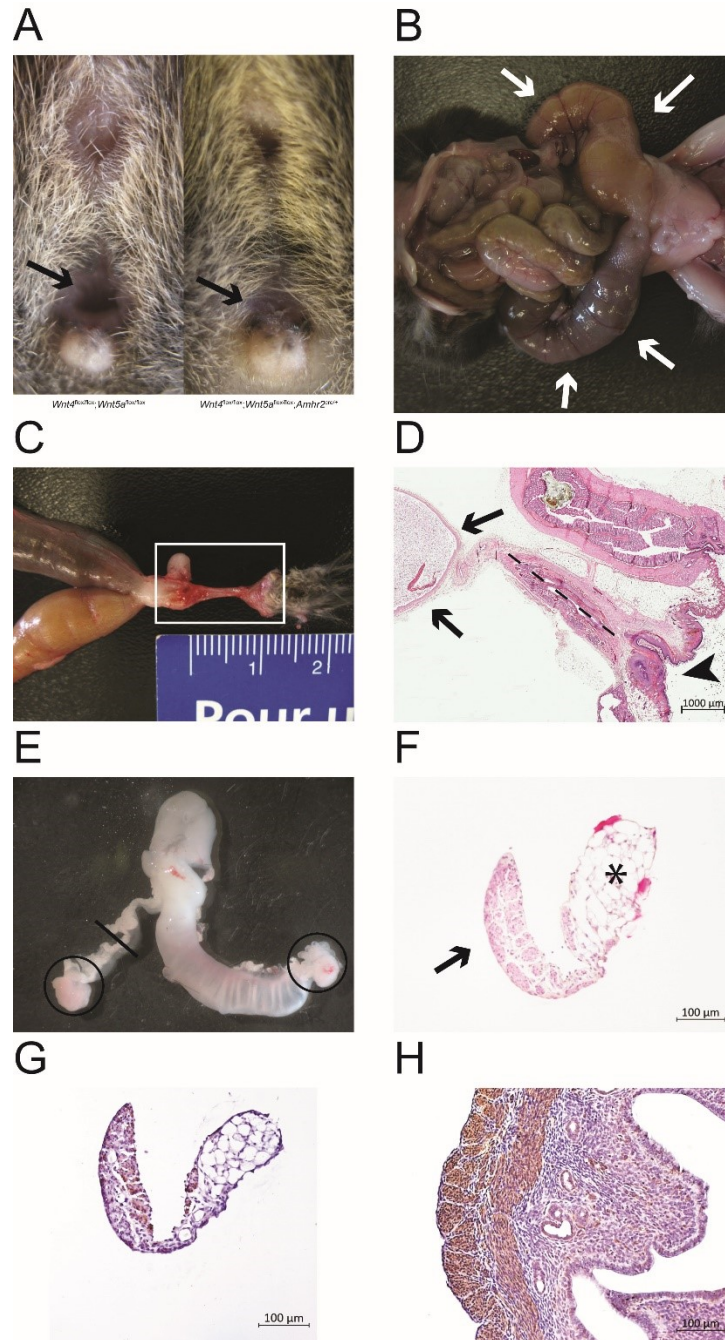
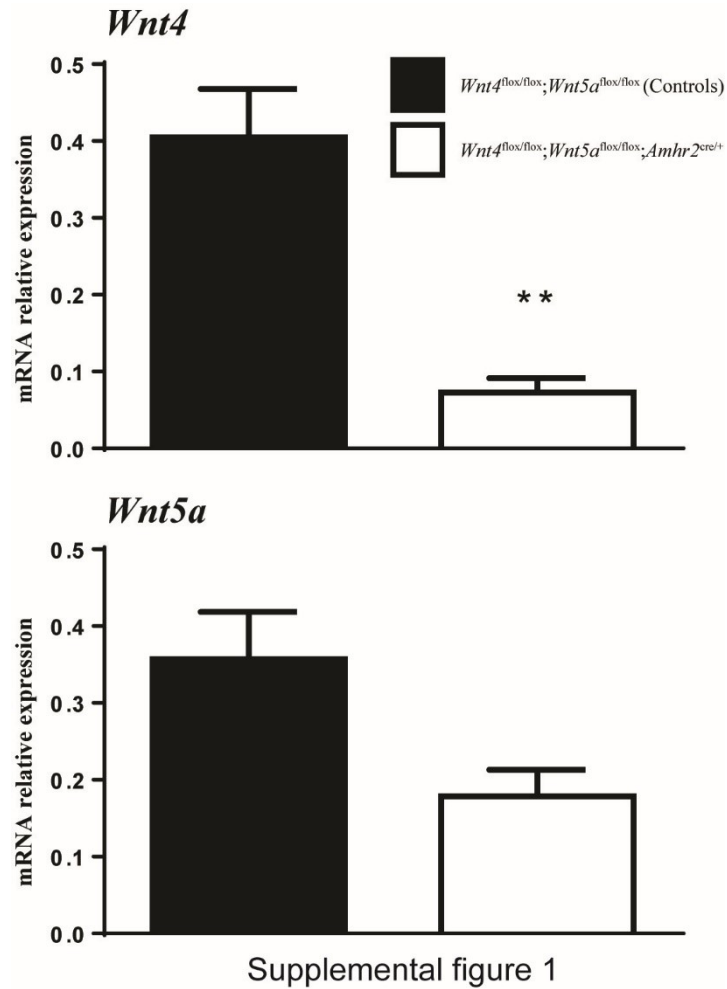


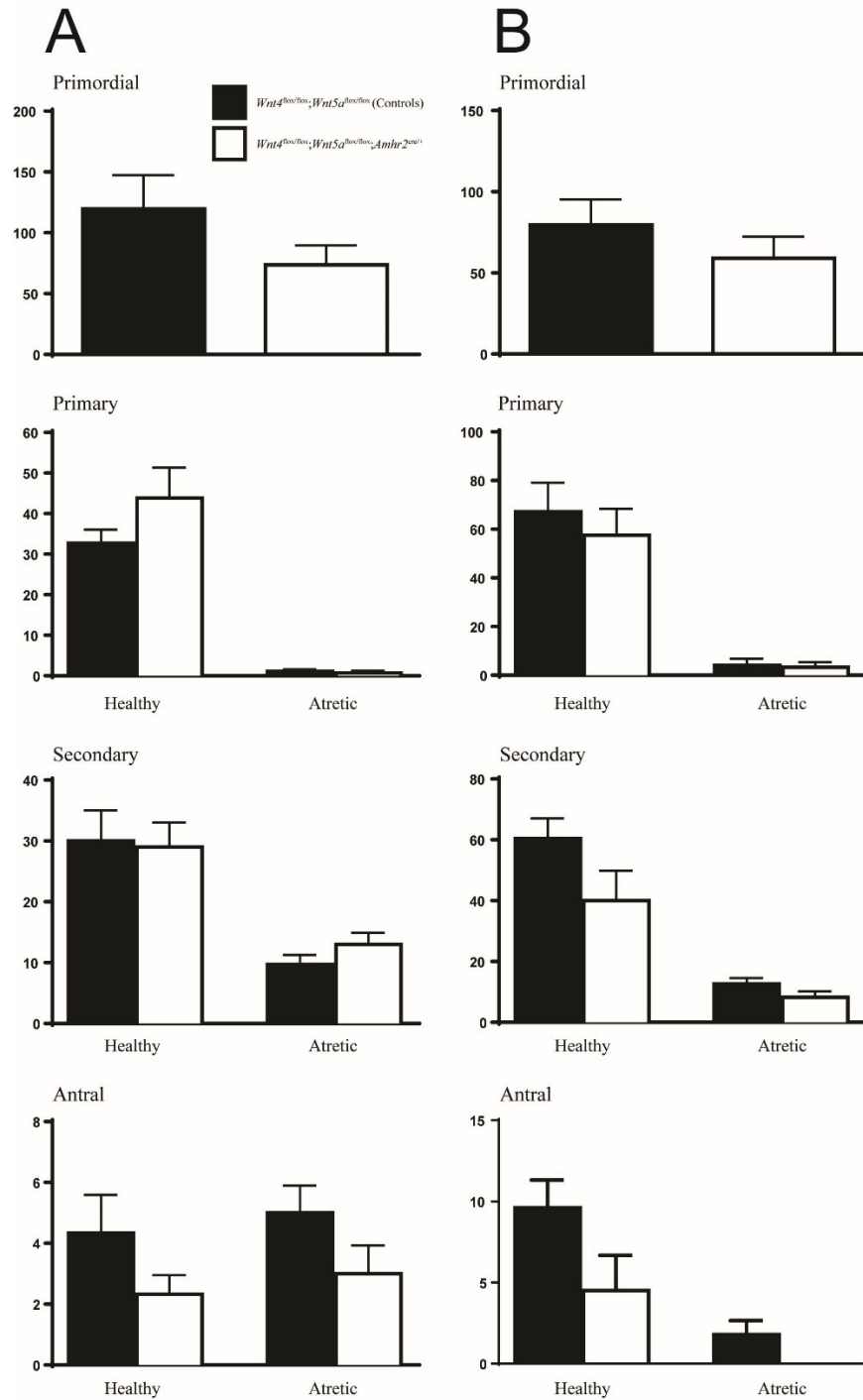
Figure 7. Müllerian agenesis in $Wnt4^{flox/flox}; Wnt5a^{flox/flox}; Amhr2^{cre/+}$ mice.

(A) Photograph of a $Wnt4^{flox/flox}; Wnt5a^{flox/flox}; Amhr2^{cre/+}$ mouse showing the absence of a vaginal opening (black arrow). (B) Mucometra in a $Wnt4^{flox/flox}; Wnt5a^{flox/flox}; Amhr2^{cre/+}$ mouse. The uterine horns (white arrows) are grossly distended by an abundant quantity of brown to beige,

mucous to slightly granular material. (C) Vaginal agenesis in a *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mouse. The vagina is replaced by a thin fibrous membrane. There is no continuity between the external genitalia and the uterine horns. (D) Photomicrograph of a histological section of the structure indicated by a white rectangle in panel C. Note distended uterine horns (black arrows) and the absence of vaginal structures connecting them to the external genitalia (black arrowhead). Only fibrous tissue and the urethra (dashed line) are present. Stain = Hematoxylin-eosin-phloxine-saffron (HEPS). (E) Agenesis of a uterine horn in a *Wnt4*^{flox/flox};*Wnt5a*^{flox/flox};*Amhr2*^{cre/+} mouse. The ovaries (encircled) were not affected. (F) Transverse section of the undeveloped uterine horn (indicated by solid line in panel E). Note the absence of a lumen and of endometrial stroma. The tissue is composed of smooth muscle (arrow) suggestive of the myometrium, and adipose tissue (indicated with an asterisk). (G) Smooth muscle actin immunohistochemistry analysis of the tissue shown in panel F. (H) Smooth muscle actin immunohistochemistry analysis of a transverse section of a uterine horn from an adult mouse.



Supplemental Figure 1. RT-qPCR analysis of *Wnt4* and *Wnt5a* mRNA levels in granulosa cells obtained from immature, eCG-treated mice. n=9 mice/genotype, data are expressed as means (columns) ± SEM (error bars). Asterisks (**) indicate a significant difference from control (P <0.01).



Supplemental Figure 2. Quantitative analysis of ovarian follicles in 42 day-old (A) and 8 month-old (B) mice.

Data are raw follicle count numbers, n=6 ovaries per group. All data are expressed as means (columns) \pm SEM (error bars).

ABBREVIATIONS

Amhr2: Antimullerian hormone receptor type 2

cAMP: Cyclic adenosine monophosphate

eCG: equine chorionic gonadotropin

Foxa2: Forkhead box protein a2

Fzd1: Frizzled-1

Lef1: Lymphoid enhancer-binding factor 1

LIF : Leukemia inhibitory factor

MOI: Multiplicity of infection

MPA: Medroxyprogesterone acetate

MRKH : Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser

mRNA: messenger RNA

Pgr : Progesterone receptor

Porcn: Porcupine

Prl8a2: Decidual prolactin

Rpl19: Ribosomal protein L19

WNT4: Wingless integration site 4

WNT5a: Wingless integration site 5a

WNT7a: Wingless integration site 7a

TABLE 1. Fertility Trial.

Genotype	n	Total litters	Total pups	Litter size
<i>Wnt4</i> ^{flox/flox} ; <i>Wnt5a</i> ^{flox/flox}	6	6.83±0.31	50.50±1.88	7.39±0.29
<i>Wnt4</i> ^{flox/flox} ; <i>Wnt5a</i> ^{flox/flox} ; <i>Amhr2</i> ^{cre/+}	6	1.17±0.48****	2.17±0.83****	1.86±0.34****

Values are expressed as means ± SEM

**** Means are significantly different (P<0.0001)

TABLE 2. Ovulation rate

Genotype	n	Total COCs	COCs/mouse
<i>Wnt4</i> ^{flox/flox} ; <i>Wnt5a</i> ^{flox/flox}	6	48	8.00±0.58
<i>Wnt4</i> ^{flox/flox} ; <i>Wnt5a</i> ^{flox/flox} ; <i>Amhr2</i> ^{cre/+}	6	42	7.00±0.37

Values are expressed as means ± SEM

SUPPLEMENTAL TABLE 1. RT-qPCR primer sequences.

Name	Sequence
<i>Wnt4</i> -S	GCGTCCTAGCCTTCTCACAGTCC
<i>Wnt4</i> -AS	ACGTCTTTACCTCGCAGGAG
<i>Wnt5a</i> -S	CCAGGTTGTTATAGAAGCTAACTTG
<i>Wnt5a</i> -AS	CAGAAGTATTGTCCACTGTGCTGC
<i>Pr18a2</i> -S	CTCACTTCTCAGGGGCACT
<i>Pr18a2</i> -AS	AGCCATTCTCTCCTGTTTGACA
<i>Rpl19</i> -S	CTGAAGGTCAAAGGGAATGTG
<i>Rpl19</i> -AS	GGACAGAGTCTTGATGATCTC

CHAPITRE 4. ARTICLE 2

Lats1 and *Lats2* are required for the maintenance of multipotency
in the Müllerian duct mesenchyme

Guillaume St-Jean¹, Mayra Tsoi¹, Atefeh Abedini², Adrien Levasseur¹, Charlene Rico¹, Martin Morin³, Bojana Djordjevic⁴, Ilkka Miinalainen⁵, Riitta Kaarteenaho⁶, Marilène Paquet⁷, Nicolas Gévry³, Alexandre Boyer¹, Barbara Vanderhyden² and Derek Boerboom¹

Affiliations :

- 1) Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada.
 - 2) Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, K1H 8M5, Canada.
 - 3) Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1, Canada.
 - 4) Department of Anatomic Pathology, Sunnybrook Health Sciences Centre, Toronto, Ontario, M4N 3M5, Canada
 - 5) Biocenter Oulu, University of Oulu, FI-90014 Oulu, Finland.
 - 6) Research Unit of Internal Medicine, University of Oulu and Medical Research Center Oulu, Oulu University Hospital, 90029, Oulu, Finland.
 - 7) Département de pathologie et de microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada.
- Corresponding author: derek.boerboom@umontreal.ca

Keywords: *Lats1/2*, uterus, Müllerian duct, mesenchyme, myofibroblast, cell fate

Publié dans *Development* en date du 18 octobre 2019, PMID: 31575647

<https://dev.biologists.org/content/146/20/dev180430>

4.1 ABSTRACT

WNT signaling plays essential roles in the development and function of the female reproductive tract. Although crosstalk with the Hippo pathway is a key regulator of WNT signaling, whether Hippo itself plays a role in female reproductive biology remains largely unknown. In this report, we show that conditional deletion of the key Hippo kinases *Lats1* and *Lats2* in Müllerian duct mesenchyme cells caused them to adopt the myofibroblast cell fate, resulting in profound reproductive tract developmental defects and sterility. Myofibroblast differentiation was attributed to increased YAP and TAZ expression (but not to altered WNT signaling), leading to the direct transcriptional up-regulation of *Ctgf* and the activation of the myofibroblast genetic program. Müllerian duct mesenchyme cells also became myofibroblasts in male mutant embryos, which impeded the development of the male reproductive tract and resulted in cryptorchidism. The inactivation of *Lats1/2* in differentiated uterine stromal cells *in vitro* did not compromise their ability to decidualize, suggesting that Hippo is dispensable during implantation. We conclude that Hippo signaling is required to suppress the myofibroblast genetic program and maintain multipotency in Müllerian mesenchyme cells.

4.2 INTRODUCTION

The Müllerian ducts (or paramesonephric ducts) are paired embryonic structures that give rise to most of the female reproductive tract. They are comprised of a luminal epithelial cell population, mesenchymal cells which surround the epithelium, and an outer coelomic epithelium. The ducts form when a population of cells from the rostral mesonephros invaginate and elongate caudally alongside the Wolffian ducts, until they join at the urogenital sinus. In male embryos, the production of anti-Müllerian hormone (AMH) causes the Müllerian ducts to degenerate, and testosterone spurs the development of the Wolffian duct into the male reproductive tract. In the female, absence of AMH allows the Müllerian ducts to further develop, fuse and differentiate into the oviducts, uterus and anterior vagina (Roly et al., 2018).

All steps of the initiation, invagination, elongation and differentiation (or degradation) of the Müllerian ducts is tightly coordinated by a number of signaling effectors and pathways. Among these, members of the WNT family of secreted glycoprotein signaling molecules play prominent roles. Using cell fate mapping and neutralizing antibodies, WNT4 was shown to be required for Müllerian duct invagination and elongation (Prunskaitė-Hyyryläinen et al., 2016), and *Wnt4*-null mice are born without Müllerian structures (Vainio et al., 1999). Additional studies in mice using hypomorphic alleles and conditional targeting have shown that *Wnt4* is also involved in the development of the oviduct and the myometrium (Prunskaitė-Hyyryläinen et al., 2016). *Wnt5a*-null mice lack both the cervix and vagina, and have short, coiled uterine horns (Mericskay et al., 2004). Moreover, deletion of the *Wnt7a* gene results in a partially posteriorized female reproductive tract, with uterus-like oviducts and a uterus with histologic characteristics of the vagina (Dunlap et al., 2011). *Wnt4*, *Wnt5a* and *Wnt7a* have also all been implicated in uterine gland formation (Dunlap et al., 2011; Farah et al., 2017b; Franco et al., 2011; Mericskay et al., 2004; St-Jean et al., 2019). Although the signaling processes whereby WNT ligands direct the development of the female reproductive tract are poorly understood, the canonical WNT signaling effector β -catenin (CTNNB1) is believed to play an important role, largely based on phenotypic abnormalities observed in *Cttnb1* conditional knockout models that mimic to some extent those observed in knockout models of specific *Wnt* genes (Deutscher & Hung-Chang Yao, 2007; Hernandez Gifford, Hunzicker-Dunn, & Nilson, 2009). How WNT signaling itself is regulated in the Müllerian duct and during reproductive tract development remains essentially unknown.

The Hippo signaling pathway plays important roles in the embryonic development of many tissues such as the heart (Heallen et al., 2011), nervous system (Bao, He, Wang, Huang, & Yuan, 2017) and kidneys (McNeill & Reginensi, 2017; Antoine Reginensi et al., 2016) by regulating cellular processes including proliferation, apoptosis and differentiation. Hippo is not activated by a specific ligand, but rather responds to a multitude of extra- and intracellular cues such as cell-cell contact, cell polarity, mechanical forces and several GPCR ligands (Lv et al., 2015; Yu et al., 2012; B. Zhao et al., 2007). The pathway consists of a core kinase cascade that culminates in the activation of the kinases large tumor suppressor (LATS) -1 and -2. Once activated, LATS1/2 can phosphorylate the transcriptional co-regulatory molecules YAP and TAZ, resulting in their cytoplasmic sequestration and degradation. Inactivation of the pathway results in the translocation of unphosphorylated YAP and TAZ to the nucleus, which bind to various transcription factors (including those of the TEAD family) to modulate the expression of specific target genes (Tsutsumi et al., 2013; B. Zhao et al., 2008). Importantly, recent studies have established functional interactions between Hippo and the canonical WNT signaling pathway. For instance, TAZ was found to inhibit WNT signaling by interacting with the WNT signaling effector Disheveled (Varelas et al., 2010). YAP/TAZ can also recruit the ubiquitin ligase β -TRCP to a multiprotein complex that directs the ubiquitination and degradation of CTNNB1 (Azzolin et al., 2014). Furthermore, YAP and CTNNB1 can physically interact when in the nucleus and bound to their respective transcription factor partners, and this interaction enhances target gene transcriptional activity (Heallen et al., 2011). Although this mutual interdependence between Hippo and canonical WNT signaling has been shown in several cell types, whether or not this occurs within the Müllerian duct during reproductive tract development has never been reported.

A few recent studies have suggested that the Hippo pathway may also play important roles in postnatal uterine physiology and disease processes. For instance, Strakova *et al.* reported decreased expression of TAZ in the nuclei of human uterine fibroblasts during *in vitro* decidualization, as well as decreased TAZ expression in the uterine stroma during the secretory phase of the menstrual cycle, suggesting a potential role in decidualization and implantation (Strakova et al., 2010). Increased expression of both *YAP* and *TEAD1* mRNA levels has also been observed during decidualization in cultured human endometrial stromal cells. Knockdown of YAP in these cells delayed the morphological and gene expression changes associated with

decidualization (H. Chen et al., 2017). Further studies have suggested roles for dysregulated YAP and/or TAZ in the pathogenesis of endometriosis (Y. Song et al., 2016) and uterine cancers (T. Liu et al., 2013; M. Zhan et al., 2016).

To determine the roles of Hippo signaling in the development and function of the female reproductive tract, we generated mouse models to inactivate *Lats1* and/or *Lats2* in Müllerian mesenchyme cells. Unexpectedly, loss of Hippo signaling caused the mesenchyme cells to lose their ability to differentiate into uterine and oviduct stromal and smooth cells. Rather, loss of *Lats1/2* directed the mesenchymal cells to adopt the myofibroblast fate, resulting in severe developmental defects of the uterus and absent oviducts. These effects were attributed to increased YAP and TAZ (but not CTNNB1) expression and transcriptional regulatory activity, leading to the activation of the myofibroblast genetic program. Together, our findings indicate a previously unsuspected role for the Hippo pathway in the maintenance of multipotency in Müllerian mesenchyme cells.

4.3 MATERIALS AND METHODS

Animal models and fertility trials

The *Lats1*^{tm1.1Jfm} (referred to herein as *Lats1*^{flox}) and *Lats2*^{tm1.1Jfm} (referred to herein as *Lats2*^{flox}) strains were obtained from Randy L. Johnson (M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX). The *Amhr2*^{tm3^(cre)Bhr} (referred to herein as *Amhr2*^{cre}) strain was obtained from Richard R. Behringer (M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX). *Lats1*^{flox}, *Lats2*^{flox} and *Amhr2*^{cre} strains were crossed so as to obtain the *Lats1*, *Lats2* and *Lats1/2* conditional knockout genotypes described in the text. All strains were maintained on a C57BL/6 genetic background. Genotyping analyses were done by PCR on DNA obtained from tail biopsies as previously described (Heallen et al., 2011; Tsoi et al., 2019)

To assess fertility in *Lats1*^{flox/flox}, *Amhr2*^{cre/+}, *Lats2*^{flox/flox}, *Amhr2*^{cre/+} and *Lats1*^{flox/flox}, *Lats2*^{flox/flox}, *Amhr2*^{cre/+} mice, 8 week-old females were housed with 8 week-old wild-type (C57BL/6) males and monitored daily for litters. Litter sizes were recorded at birth. The males were removed after 6 months and the experiment was terminated 22 days later to allow for the birth of a final litter. Seven 8 week-old *Lats1*^{flox/flox}, *Lats2*^{flox/flox}, *Amhr2*^{cre/+} males were similarly housed with females for two months. Of these, five failed to sire pups, one sired a litter of four pups, and another sired three litters of one, four and one pup, respectively.

Morphological and histological evaluation of Müllerian ducts and uteri.

Lats1^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox} (control) and *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} (cko) embryos and mice were obtained at E14.5, E17.5, E19.5, P1, P21 and 2-4 months (adult) of age. For E14.5, E17.5 and E19.5 embryos, *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox} adult females were crossed with either *Lats1*^{flox/+}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} or *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/+}; *Amhr2*^{cre/+} males (as cko males were infertile), and observed every morning for the presence of a vaginal plug (defined as E0.5). Gravid uteri were dissected to collect the embryos, tail biopsies taken from each embryo for genotype analyses, and the whole embryos fixed for 24h in 4% paraformaldehyde (PFA) prior to paraffin embedding. A subset of E17.5 and E19.5 embryos was dissected to isolate the Müllerian ducts prior to fixing (PFA, 4h) and embedding. Reproductive tracts from P1, P21 and adult mice uteri were collected, fixed in 10% neutral buffered formalin and paraffin-embedded. Sections of whole embryos, Müllerian ducts and reproductive tracts were prepared at a thickness of 3µm and stained either with hematoxylin and eosin-phloxine (HE), hematoxylin-eosin-phloxine-saffron (HEPS), or Picrosirius red. For transmission electron microscopy, uteri from P1 mice were collected and fixed in 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer. Processing of the tissue and transmission electron microscopy analyses were performed by the Facility for Electron Microscopy Research (FEMR) at McGill University.

RT-qPCR analyses and DNA microarray

Müllerian ducts (E17.5) and uteri (P1) were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C prior to RNA extraction. Total RNA was extracted using the QIAGEN RNeasy mini kit (Qiagen, Montreal, QC, Canada) according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and quality was assessed using a NanoDrop-1000 spectrophotometer (Thermo-Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada). RNA was reverse-transcribed using the SuperScript Vilo cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Real-time PCR reactions were run using a CFX96 Real-Time System/ C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) and Universal SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad). PCR reactions consisted of 2.3 µl of H₂O, 6 pmol of each forward and reverse gene-specific primer, and 7.5 µl of SYBR Green Supermix. Standard curves were generated using

serial dilutions of cDNA, and amplification efficiency (E) values were obtained using the slope of the log-linear phase derived from the formula $E = e^{(1/\text{slope})}$. Only primer pairs with efficiency values between 1.8 and 2.2 were used. The thermal cycling program to amplify transcripts typically 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. To quantify relative gene expression, the cycle threshold (Ct) values for each transcript were compared with that of *Rpl19*, according to the ratio $[R = (E^{Ct_{Rpl19}}/E^{Ct_{\text{target}}})]$. MIQE guidelines were followed throughout. Primer sequences are listed in Table S3.

Total RNA from E17.5 Müllerian ducts (n=3 per group) was submitted to the McGill University and Génome Québec Innovation Centre (Montreal, Quebec, Canada) for microarray analysis using the Affymetrix Clariom S Mouse assay. Results were analyzed using Transcriptome Analysis Console software (TAC 4.0) (Thermo Fisher). Thresholds used for p-value and fold change were 0.05 and ± 2 , respectively. Further analyses were performed using the Metascape gene annotation and analysis resource (<http://metascape.org>) (Y. Zhou et al., 2019).

***In vitro* stromal cell culture and decidualization assessment**

Female *Lats1*^{flx/flx}, *Lats2*^{flx/flx} mice ranging from 8 to 12 weeks of age were injected daily with estradiol (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) (100 ng, SC) for three days prior to endometrial stromal and epithelial cell isolation and culture. All steps of cell purification, culture and *in vitro* decidualization were done essentially as described by De Clercq et al (De Clercq et al., 2017). Freshly-isolated stromal cells were incubated overnight to permit attachment to the cell culture plates, and subsequently infected with Ad-Cre or Ad-eGFP (Vector development laboratory, Baylor College of Medicine, Houston, TX) at an MOI of approximately 50 for 24h. Following washes, stromal cells were co-cultured with epithelial cells grown in ThinCert cell culture inserts (Greiner Bio-One International, Kremsmünster, Austria), so as to maintain the stromal and epithelial cells separate but able to communicate via a semi-permeable membrane. Following medroxyprogesterone/cAMP (Sigma Aldrich) treatment for 48-72h, *Lats1*, *Lats2* and *Prl8a2* mRNA levels were assessed by RT-qPCR as described above. Similar experiments were also performed without co-culturing with epithelial cells and *Acta2*, *Cnn1*, *Cald1* mRNA levels were assessed by RT-qPCR as described above.

Immunohistochemistry and proliferation assay

Immunohistochemical (IHC) analyses were performed either on PFA (E17.5) or formalin (P1) fixed, paraffin-embedded Müllerian ducts and uteri sectioned at a thickness of 3 μm . Following deparaffinization, rehydration, sodium citrate heat-mediated antigen retrieval and peroxidase block, primary antibodies were diluted in Signal Stain Antibody Diluent (8112; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and incubated overnight at 4°C. Antibodies used include LATS1 at 1:100 - 1:500 (SC-28223; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), LATS2 at 1:600 (orb6306; Biorbyt, San Francisco, CA, USA), YAP at 1:200 (4912S; Cell Signaling Technology), TAZ at 1:500 (4883S; Cell Signaling Technology), pYAP at 1:100 (13008S; Cell Signaling Technology), Vimentin at 1:100 (5741S; Cell Signaling Technology), PTGS2 at 1:300 (12282S; Cell Signaling Technology) total CTNNB1 at 1:100 (D10A8; Cell Signaling Technology), active CTNNB1 at 1:600 (D13A1; Cell Signaling Technology), pre-diluted CK19 (ab961; Abcam, Toronto, ON, Canada), PAX8 at 1:1000 (10336-1-AP; Proteintech, Cedarlane, Burlington, ON, Canada), Inhibin at 1:100 (M3609; Dako, Carpinteria, CA, USA), Calretenin at 1:50 (MA5-14540; Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), WT1 at 1:100 (M3561; Dako), CK5 at 1:200 (MA5-17057; Thermo Fisher), PAX2 at 1:100 (ab79389; Abcam) and Ki67 at 1:250 (ab16667, Abcam). Detection was performed with the Vectastain Elite ABC HRP Kit (Vector Laboratories, # PK-6101) and the 3,3' diaminobenzidine peroxidase substrate kit (Vector Laboratories, #SK-4100). Slides were counterstained with hematoxylin prior to mounting. IHC for smooth muscle actin was done using a LabVision autostainer (Thermo-Fisher Scientific), with the primary antibody (MU128-UC; Biogenex, Fremont, CA, USA) diluted at 1:100 and incubated for 1 hour at room temperature. Detection was performed using Kit Envision System AEC Mouse (K4005; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). To assay proliferation, 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (B5002; Sigma Aldrich) was dissolved as per manufacturer instructions (10mg/ml in 0.9% saline) and injected in gravid mice at E17.5 (100 mg/kg, IP). Mice were sacrificed 3 hours post-injection. Embryos were collected, fixed for 24 hours in PFA, paraffin-embedded and 3 μm sections prepared. Immunohistochemistry was then done using the M.O.M. Kit (PK-2200; Vector Laboratories) with the BrdU primary antibody (M0744; Agilent Technologies) incubated at the

manufacturer's suggested dilution for 1 hour at room temperature. Detection was then performed using the Vectastain Elite ABC kit as described above.

Chromatin immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments were performed using frozen uteri (P1) as previously described (Svotelis, Gévry, & Gaudreau, 2009), with the exception of using magnetic dynabeads (ThermoFisher Scientific, #10002D) for immunoprecipitation. Briefly, samples (n=4 biological replicates per group, 3 pooled uteri per replicate) were crosslinked with formaldehyde 1.1% for 10 min at 37°C with agitation. The crosslinking reaction was stopped by addition of glycine (0.125 M for 10 min at 37°C with agitation) followed by two washes with cold PBS. Crosslinked uteri were ground in SDS lysis buffer using a mortar and pestle prior to sonication. Immunoprecipitation was done using 1 µg of TAZ antibody (4883S; Cell Signaling Technology), 1 µg of YAP antibody (NB110-58358; Novus biological, Centennial, CO, USA), or no antibody as background control. qPCR assays were performed on immunoprecipitated DNA and quantified using a standard curve derived from total (i.e., input) DNA. Background signal was removed by subtracting the signal obtained in “no antibody” controls from that obtained in samples immunoprecipitated with the YAP or TAZ antibodies. Primers used for the amplification of specific regions of the *Ctgf* promoter are listed in Table S4. Background results were brought to 0.1 % of input for TAZ enrichment and 0.1 % of input for YAP enrichment.

Statistical analysis

Analyses were performed using Graph Pad Prism 6 software (GraphPad Software, Inc.). All data were subjected to the F test to determine the equality of variances. Data were transformed to logarithms if they were not normally distributed. Statistical significance was determined using unpaired Student's t test or ANOVA, with $p < 0.05$ considered significant. Data are presented as means \pm s.e.m.

4.4 RESULTS

Loss of *Lats1* and *Lats2* results in multiple developmental defects of the Müllerian duct and female reproductive tract.

To study the roles of the Hippo pathway in the development and physiology of the female reproductive tract, we first determined the expression of its key components. Immunohistochemical analyses showed weak TAZ expression throughout all stages of development compared to the other Hippo effectors. Staining was mostly absent in E17.5 and newborn mice, whereas weak cytoplasmic staining appeared in the endometrium and myometrium of adult mice (Fig. S1). Conversely, high levels of LATS1, LATS2 and YAP expression were found at all stages of development. Their expression localized mostly to the nucleus during early stages of development (E17.5 and newborn) in the Müllerian mesenchyme/uterine stroma, along with scant cytoplasmic signal in the luminal epithelium. In adult mice, LATS1, LATS2 and YAP nuclear and cytoplasmic expression was observed in all parts of the uterus (Fig. S1). PhosphoYAP expression mirrored that of YAP at E17.5, but was absent in the uteri of newborn mice. Cytoplasmic phosphoYAP expression then reappeared throughout the uterus in adult mice. (Fig. S1).

To inactivate Hippo signaling in the female reproductive tract, mice bearing floxed alleles for *Lats1* and/or *Lats2* were crossed with the *Amhr2^{cre}* strain, which targets the mesenchyme cells of the Müllerian duct, starting at the rostral end as early as E12.5 in mice of both sexes (Arango et al., 2008; Jamin, Arango, Mishina, Hanks, & Behringer, 2002). Whereas *Lats1^{flox/flox}; Amhr2^{cre/+}* and *Lats2^{flox/flox}; Amhr2^{cre/+}* females were fertile and had reproductive tracts that appeared normal at the gross and histologic levels (not shown), *Lats1^{flox/flox}; Lats2^{flox/flox}; Amhr2^{cre/+}* females were sterile (Table S1). Developmental time course analyses of the reproductive tracts of *Lats1^{flox/flox}; Lats2^{flox/flox}; Amhr2^{cre/+}* mice revealed numerous anomalies. Although no changes were apparent at E14.5 (not shown), by E17.5 the Müllerian duct was markedly thickened, with the presence of an abnormal cell population with an elongated, abundant, slightly eosinophilic cytoplasm and a plump nucleus. These appeared to replace most of the antimesometrial mesenchyme cell population (Fig. 1A). RT-qPCR analyses confirmed the loss of *Lats1* and *Lats2* expression in the Müllerian ducts of *Lats1^{flox/flox}; Lats2^{flox/flox}; Amhr2^{cre/+}* mice, and immunohistochemical analyses showed that this loss of expression localized specifically to the ectopic cell population (Fig. S2). The changes in the

Müllerian duct appeared to prevent it from elongating normally, resulting in coiling that could be seen macroscopically by E19.5 (Fig. 1B). *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} females were born with plump and shortened uterine horns (Fig. 1B), with the ectopic cell population now appearing more differentiated and occupying most of the axial and antimesometrial regions of the uterine horns (Fig. 1A). In juvenile and adult mice, there was a severe architectural disorganization of the uterine layers, with an absence of demarcation between the endometrium and myometrium. Due to coiling, multiple lumens were often visible in transverse sections, and glands were sparse or absent. Cystic structures were often present adjacent to the ovary in juvenile mice (Fig. 1B). These were lined with ciliated epithelial cells (Fig. 1B, inset), and presumed to be severely dilated oviduct. These structures typically ruptured by adulthood, leaving tattered remains and no recognizable oviduct. The ovaries were connected to the uterine walls by bands of tissue consisting of disorganized fibroblasts and smooth muscle cells (Fig. 1B, inset).

Loss of Hippo signaling causes Müllerian mesenchyme cells to commit to the myofibroblast fate.

To characterize the cellular changes observed in the Müllerian ducts of *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice, we assessed proliferation by BrdU incorporation at E17.5. Interestingly, the ectopic cell population was found to be non-proliferative, in contrast to the adjacent mesenchyme cells and Müllerian and coelomic epithelial cells (Fig. 2A). RT-qPCR and immunohistochemical analyses also showed a reduction in expression of the pluripotency markers *Sox2*, *Nanog* and *Oct4* in the Müllerian ducts, which was due to their absence in the ectopic cell population (Fig. 2B). These cells further stained positive for vimentin and smooth muscle actin (α -SMA), and picrosirius red stain showed abundant collagen deposition in proximity to the ectopic cells, together strongly suggesting that they were myofibroblasts (Fig. 2C). This hypothesis was confirmed by transmission electron microscopy, which showed the presence of ultrastructural features including thick intracellular actin belts and fibronexus junctions (Fig. 2D) that distinguish myofibroblasts from fibroblasts or smooth muscle cells (Eyden, 2008). Together, these findings indicate that loss of Hippo signaling in Müllerian mesenchyme cells causes them to lose their multipotency, while directing them to adopt the myofibroblast cell fate. In the uterus of adult *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice, the

myofibroblasts were found interspersed between haphazard clusters of endometrial stromal cells and myometrial smooth muscle cells (Figs. 1A, 2E).

Ovarian malformations in *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice.

Ovaries from *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice were examined, as the *Amhr2*^{cre} allele also drives Cre expression in follicular granulosa cells and (to some extent) the ovarian stroma and surface epithelium (Arango et al., 2008; W.M. Baarends et al., 1994; Teixeira et al., 1996). In adult mice, a general reduction in the abundance of follicles was noted (Fig. 3). Corpora lutea were usually present, indicating that at least some follicles were able to develop fully, ovulate and luteinize. Some areas of cellular changes consistent with loss of granulosa cell differentiation were observed, as had been previously observed in the *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *CYP19*-cre model (Tsoi et al., 2019). In these areas, granulosa cells appeared to be replaced by large, round to polygonal cells with abundant, clear and slightly eosinophilic cytoplasm (Fig. 3, inset in image of mutant adult). The most striking change, however, was that most ovaries were partially covered by a thick layer of haphazardly organized, poorly differentiated elongated cells, suggestive of a neoplasm originating from the surface epithelium (Fig. 3). However, immunohistochemical analyses of ovarian cancer markers showed that these cells did not correspond to any known ovarian tumor type (Table S2). Furthermore, they did not increase in number nor did they become invasive in older animals. A subsequent developmental timecourse analysis showed that these cells in fact appeared to originate from the ovarian stroma. Morphologic changes in the stroma were evident as early as E17.5 (Fig. 3), and seemed to develop into areas of exuberant overgrowth that extended past the ovarian surface, the growth of which appeared to be self-limiting.

Male reproductive tract defects in *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice.

Developmental anomalies of the reproductive tract were also observed in male *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice. Rather than undergoing apoptosis during Müllerian duct regression (which is normally mostly completed around E15.5 (Arango et al., 2008)), Müllerian mesenchyme cells persisted in *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} males and underwent changes similar to those observed in females. Histological analyses of E17.5 embryos showed the presence of Müllerian duct-derived myofibroblasts adjacent to the

Wolffian ducts (Fig. 4A). These subsequently interfered with the elongation of the Wolffian ducts in a manner analogous to the Müllerian duct elongation defects observed in *Lats1*^{flox/flox}, *Lats2*^{flox/flox}, *Amhr2*^{cre/+} females. As a result, newborn mice had thick and abnormally coiled epididymides and deferent ducts, with the head and body of the epididymis ectopically positioned at the cranial pole of the testis alongside the tail (Fig. 4A). The testes failed to descend in the mutant mice, resulting in pathological changes associated with cryptorchidism (e.g., testicular hypoplasia, atrophy, fibrosis, mineralization) in adults (Fig. 4B). Dilation of seminiferous tubules and of the epididymis (Fig. 4B) was also frequently observed in adult mice, suggesting that the developmental defects resulted in mechanical obstruction. Spermatozoa were rarely observed in the epididymis, and most *Lats1*^{flox/flox}, *Lats2*^{flox/flox}, *Amhr2*^{cre/+} males failed to sire litters in breeding trials.

Loss of *Lats1* and *Lats2* in endometrial stromal cells does not compromise their ability to undergo decidualization

As previous studies have suggested a role for the Hippo pathway in decidualization (H. Chen et al., 2017; Strakova et al., 2010), we determined if loss of *Lats1* and *Lats2* affects the ability of endometrial stromal cells to decidualize. As the uterine developmental defects in the *Lats1*^{flox/flox}, *Lats2*^{flox/flox}, *Amhr2*^{cre/+} model precluded its use in conventional, *in vivo* decidualization assays, endometrial stromal cells from *Lats1*^{flox/flox}, *Lats2*^{flox/flox} mice were placed in culture and infected with an adenovirus to drive Cre expression (Ad-Cre, to inactivate the floxed alleles) or an adenovirus that drives expression of eGFP (Ad-eGFP, control) for 24h. Ad-cre treatment resulted in $\approx 99\%$ and $\approx 90\%$ reduction of *Lats1* and *Lats2* mRNA levels, respectively (Fig. 5A). Following removal of the adenovirus, stromal cells were co-cultured with endometrial epithelial cells (separated by a semi-permeable membrane) and treated or not with medroxyprogesterone and cAMP to induce decidualization over a period of 48-72h. Both the Ad-Cre and Ad-eGFP-treated stromal cells responded to medroxyprogesterone + cAMP with a dramatic increase in decidual prolactin (*Prl8a2*) mRNA levels, indicating that decidualization occurred in both groups (Fig. 5A). Ad-Cre treatment did not change the mRNA levels of myofibroblast markers (Fig. 5B), indicating that loss of *Lats1/2* did not cause differentiated endometrial stromal cells to adopt myofibroblast characteristics. These results therefore suggest

that Hippo signaling is dispensable for decidualization and cell fate maintenance in the uterine stroma.

Loss of *Lats1/2* causes a YAP/TAZ-driven induction of *Ctgf* and the myofibroblast genetic program

To elucidate the mechanism whereby loss of Hippo signaling causes Müllerian mesenchyme cells to commit to the myofibroblast cell fate, we first examined CTNNB1 expression in the uteri of newborn *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice. Although loss of *Lats1/2* was predicted to result in the hypophosphorylation and stabilization of CTNNB1 (Varelas et al., 2010), both activated (i.e., unphosphorylated) and total CTNNB1 levels were in fact decreased in *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} myofibroblasts relative to control Müllerian mesenchyme and endometrial stromal cells (Fig. 6A). Conversely, YAP and TAZ levels were markedly increased in the mutant myofibroblasts. RT-qPCR analyses of uteri from *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice showed a strong and significant increase in the mRNA levels of the well-established YAP/TAZ target genes *Ctgf* (≈ 6 fold) and *Cyr61* (≈ 12 fold) relative to controls (Fig. 6B). Together, these results indicate that the loss of *Lats1/2* resulted in the inactivation of the canonical Hippo pathway in the *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} model, but did not induce CTNNB1 signaling.

To further determine how the loss of Hippo signaling affected the transcriptome in the Müllerian mesenchyme, ducts from E17.5 *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} and control mice were analyzed by microarray. These analyses identified 716 genes that were differentially expressed between genotypes by 2-fold or more. Of these, genes that were upregulated in the Müllerian ducts of *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice (n = 547) were subjected to gene ontology analysis using the Metascape gene annotation and analysis resource. This showed that the upregulated genes regulate biological process including blood vessel morphogenesis, the inflammatory response, extracellular matrix organization, wound healing and actin filament-based processes (Fig. S3), all of which are associated with myofibroblast functions ((Klingberg, Hinz, & White, 2013); (Gerarduzzi & Di Battista, 2017). Furthermore, 6 out of the 20 most highly upregulated genes have been associated with myofibroblast activation, differentiation or function (genes in bold, Table 1) (Elbjeirami et al., 2010; Garrett et al., 2004; Gomez et al., 2016; Lenga et al., 2008; Lipson, Wong, Teng, & Spong, 2012; Mifflin et al., 2002; Nightingale

et al., 2004; Sobral et al., 2011). RT-qPCR analyses were done for selected genes to confirm the microarray analyses (Fig. 6B), and the most highly upregulated gene (*Ptgs2*) was evaluated by immunohistochemistry, which localized its expression to the myofibroblast cell population of newborn *Lats1*^{flx/flx}; *Lats2*^{flx/flx}; *Amhr2*^{cre/+} mice, and its absence in controls (Fig. 6C). Genes that were downregulated in the Müllerian ducts of *Lats1*^{flx/flx}; *Lats2*^{flx/flx}; *Amhr2*^{cre/+} mice were fewer in number (n = 169) and were associated with biological process including reproductive structure development and developmental growth (Fig. S3). The most downregulated gene identified in the microarray analysis was *Amhr2* (Table 2), the expression of which is normally restricted within the Müllerian duct to the mesenchyme cells (Arango et al., 2008). These results support the notion that loss of *Lats1/2* results in the activation of the myofibroblast genetic program, while shutting off that of the Müllerian mesenchyme cells.

To determine how YAP and TAZ may activate the myofibroblast genetic program, we examined their physical association with the promoter of *Ctgf*, a gene with established roles in myofibroblast differentiation and activation, and which is overexpressed in the *Lats1*^{flx/flx}; *Lats2*^{flx/flx}; *Amhr2*^{cre/+} model (Fig. 6B, Table 1). Chromatin immunoprecipitation analyses showed enhanced binding of YAP to the *Ctgf* promoter in the uteri of *Lats1*^{flx/flx}; *Lats2*^{flx/flx}; *Amhr2*^{cre/+} mice relative to controls, within ≈100 bp from transcriptional start site, in an area which encompasses three consensus TEAD binding motifs (Fig. 7A). A much more marked enhancement (≈10-fold) was obtained for TAZ in the same region of the promoter (Fig. 7B). These data indicate that YAP/TAZ induce *Ctgf* transcription through direct binding of its promoter, and that TAZ may play a preponderant role in the induction of *Ctgf* expression in the *Lats1*^{flx/flx}; *Lats2*^{flx/flx}; *Amhr2*^{cre/+} model.

4.5 DISCUSSION

***Lats1* and *Lats2* are determinants of Müllerian mesenchyme cell fate**

Several reports have shown that the Hippo pathway can act in pluripotent cell types to direct cell fate specification. For instance, during early embryonic development, Hippo signaling must be differentially regulated in the inner and outer cells of the morula to permit proper adoption of either the inner cell mass or trophectoderm cell fate (Sasaki, 2017). In the optic vesicle, YAP and TAZ cause pluripotent progenitor cells to adopt the retinal pigment

epithelial cell fate (Miesfeld et al., 2015). In the liver, YAP/TAZ expression and activity determine whether hepatoblasts/progenitor cells become either hepatocytes or cholangiocytes (D. H. Lee et al., 2016; Nguyen, Anders, Alpini, & Bai, 2015). Likewise, Hippo signaling also appears to direct progenitor cells to give rise either to nephron epithelial cells or myofibroblasts in the developing kidney (McNeill & Reginensi, 2017). In this report, we show that Hippo signaling plays a similar role in Müllerian mesenchyme cells. Indeed, loss of Hippo activity in *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice caused Müllerian mesenchyme cells to cease proliferating, and adopt morphological, functional and gene expression characteristics of myofibroblasts. Simultaneously, these cells lost the expression of markers of pluripotency, apparently along with the capacity to become endometrial stromal and myometrial smooth muscle cells. That the inactivation of *Lats1* or *Lats2* alone in Müllerian mesenchyme cells has no discernable effect shows that *Lats1* and *Lats2* are entirely functionally redundant in this context. Together, these results define a key function of Hippo signaling in the developing female reproductive tract, and provide novel insight into the biology of Müllerian mesenchyme cells.

Induction of the myofibroblast cell fate in *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice involves YAP/TAZ-dependent induction of *Ctgf*, but not CTNNB1

As Hippo is a known regulator of WNT signaling, we originally expected that the inactivation of Hippo signaling in the *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} model would result in the stabilization of CTNNB1 in Müllerian mesenchyme cells. However, we were unable to find any evidence of enhanced CTNNB1 expression. Consistent with this, the phenotypic changes observed in the reproductive tracts of *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice appeared completely unrelated to those in any previously reported mouse models in which WNT signaling was altered in the Müllerian duct (Dunlap et al., 2011; Farah et al., 2017b; Franco et al., 2011; Mericskay et al., 2004; Prunskaitė-Hyyryläinen et al., 2016; St-Jean et al., 2019; Vainio et al., 1999). Inactivation of Hippo in *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice did however clearly result in the activation of the canonical Hippo effectors YAP and TAZ, as evidenced by their increased expression, along with that of their transcriptional target genes. WNT and Hippo signaling may therefore work independently of each other in Müllerian mesenchyme cells. Moreover, YAP/TAZ can even antagonize CTNNB1 signaling in certain

contexts (H. W. Park et al., 2015), although we were unable to determine if this occurs in the *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} model.

CTGF has been previously described as a key driver of myofibroblast activation and differentiation (Garrett et al., 2004; Grotendorst, Rahmanie, & Duncan, 2004; Klingberg et al., 2013; Lipson et al., 2012; Sakai et al., 2017; Z. Yang et al., 2015). Furthermore, it is thought to be a direct transcriptional target of the Hippo pathway (Di Benedetto et al., 2016; B. Zhao et al., 2008), and is among the most highly overexpressed genes in the Müllerian ducts of *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice. Together, these observations suggested that the induction of *Ctgf* could be a key mechanism whereby loss of Hippo signaling causes Müllerian mesenchyme cells to commit to the myofibroblast fate in the *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} model, and prompted us to investigate the underlying mechanism. We were able to show an enhanced recruitment of YAP and TAZ to the proximal promoter of *Ctgf* in a region that includes a cluster of three consensus TEAD binding motifs, strongly suggesting that overexpressed YAP and TAZ induce *Ctgf* transcription through direct association with its promoter. This does not however exclude that additional mechanism(s) may be involved. For instance, *Ctgf* expression can also be regulated by TGF β signaling via the SMAD2/3/4 pathway (Y. Liu, H. Liu, et al., 2013; Parada, Li, Iwata, Suzuki, & Chai, 2013) in contexts such as tissue repair and fibrosis (Lipson et al., 2012; Rachfal & Brigstock, 2003; Sakai et al., 2017; Tian, Yang, & Liu, 2012). Several reports have shown that YAP/TAZ interact with SMAD complexes following TGF β stimulation, and that this interaction serves to regulate both SMAD2/3/4 transcriptional activity and subcellular localization (Attisano & Wrana, 2013; Grannas et al., 2015; Mauviel, Nallet-Staub, & Varelas, 2012; Szeto et al., 2016). It is therefore possible that YAP/TAZ modulation of the TGF β pathway contributes to driving *Ctgf* overexpression in the *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} model. Further experiments will be required to test the latter hypothesis, as well as to determine the relative role of CTGF in driving the phenotypic changes observed in *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice.

Persistence of Müllerian structures in male *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice

Male reproductive tract defects were not expected in the *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} model, given the specificity of the *Amhr2*^{cre} allele for the Müllerian duct. Although the exact mechanism underlying the development of these defects remains unclear, it can be

surmised that loss of *Lats1* and *Lats2* occurred in the Müllerian ducts of male mice prior to the AMH signal that would have initiated their degradation. Our microarray data showed that *Amhr2* expression is dramatically downregulated in the Müllerian ducts in *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} female mice, suggesting that loss of *Lats1* and *Lats2* could result in rapid loss of AMHR2 and consequential insensitivity to AMH. Once the Müllerian mesenchyme cells were committed to the myofibroblast fate, they appeared to interfere mechanically with the coiling and development of the epididymides and deferent ducts, and causing the testes to fail to descend, leading to pathological secondary changes in the testes as well. Some of the changes observed in the testes of *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice may also have been due to loss of *Lats1/2* expression in Leydig and/or Sertoli cells, as the *Amhr2*^{cre} allele has previously been shown to drive some level of Cre expression in both cell types (Boyer, Hermo, Paquet, Robaire, & Boerboom, 2008; Jeyasuria et al., 2004). However, it was impossible to unambiguously attribute phenotypic changes specifically to conditional gene inactivation in testicular cells due to the confounding factor of cryptorchidism.

***Lats1* and *Lats2* may be dispensable in endometrial stromal cells following cell fate determination**

A small number of studies have suggested that YAP/TAZ may play a role in the adult uterus in processes such as decidualization and implantation (H. Chen et al., 2017; Strakova et al., 2010). This prompted us to determine if the loss of Hippo signaling in endometrial stromal cells would affect their ability to decidualize. We found that loss of *Lats1/2* had no effect on decidualization in cultured endometrial stromal cells. Although this suggests that Hippo signaling is dispensable in this context, it does not necessarily indicate that YAP and TAZ do not play a role. At most, it suggests that YAP and TAZ overexpression does not inhibit decidualization in the short term. Further experiments targeting Hippo pathway effectors including *Yap* and *Taz* *in vivo* will be required to make a definitive determination. Our findings indicate that loss of *Lats1/2* in fully differentiated endometrial stromal cells does not cause any apparent loss of function or cause them to become myofibroblasts, unlike what occurs in their Müllerian mesenchyme precursors. For this reason, inactivation of Hippo effectors *in vivo* to study their roles in decidualization will likely require a strategy that avoids targeting the uterine

stroma at developmental stages prior to the commitment of mesenchyme cells to the stromal cell fate.

In summary, we report here a previously unsuspected role of the Hippo pathway in the development of the female reproductive tract. *Lats1/2* activity was found to be necessary to preserve the multipotency of Müllerian mesenchyme cells and prevent them from committing to the myofibroblast cell fate. Further studies will be required to better define how Hippo signaling is regulated and acts throughout reproductive tract development, as well as its potential roles in reproductive physiology.

4.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Ms. Nancy Veilleux and Ms. Jacinthe Cardin for assistance with sectioning of processed tissues and Ms. Jeannie Mui for assistance during the preparation and evaluation of tissue for transmission electron microscopy.

4.7 FUNDING

Canadian Institutes of Health Research (CIHR) project grant MOP-142445 (to DB). GSJ was supported by a doctoral research award from the Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS).

4.8 CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None declared.

4.9 REFERENCES

1. Arango, N. A., Kobayashi, A., Wang, Y., Jamin, S. P., Lee, H. H., Orvis, G. D., & Behringer, R. R. (2008). A mesenchymal perspective of Mullerian duct differentiation and regression in *Amhr2-lacZ* mice. *Mol Reprod Dev*, 75(7), 1154-1162. doi:10.1002/mrd.20858
2. Attisano, L., & Wrana, J. L. (2013). Signal integration in TGF- β , WNT, and Hippo pathways. *F1000Prime Reports*, 5, 17. doi:10.12703/P5-17

3. 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
4. Baarends, W. M., van Helmond, M. J., Post, M., van der Schoot, P. J., Hoogerbrugge, J. W., de Winter, J. P., . . . Meijers, J. H. (1994). A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct. *Development*, *120*(1), 189-197.
5. Bao, X. M., He, Q., Wang, Y., Huang, Z. H., & Yuan, Z. Q. (2017). The roles and mechanisms of the Hippo/YAP signaling pathway in the nervous system. *Yi Chuan*, *39*(7), 630-641. doi:10.16288/j.ycz.17-069
6. Boyer, A., Hermo, L., Paquet, M., Robaire, B., & Boerboom, D. (2008). Seminiferous tubule degeneration and infertility in mice with sustained activation of WNT/CTNNB1 signaling in sertoli cells. *Biol Reprod*, *79*(3), 475-485. doi:10.1095/biolreprod.108.068627
7. Chen, H., Song, Y., Yang, S., Fu, J., Feng, X., & 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
8. De Clercq, K., Hennes, A., & Vriens, J. (2017). Isolation of Mouse Endometrial Epithelial and Stromal Cells for In Vitro Decidualization. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*(121), 55168. doi:10.3791/55168
9. Deutscher, E., & Hung-Chang Yao, H. (2007). Essential roles of mesenchyme-derived beta-catenin in mouse Mullerian duct morphogenesis. *Dev Biol*, *307*(2), 227-236. doi:10.1016/j.ydbio.2007.04.036
10. Di Benedetto, A., Mottolese, M., Sperati, F., Ercolani, C., Di Lauro, L., Pizzuti, L., . . . Maugeri-Saccà, M. (2016). The Hippo transducers TAZ/YAP and their target CTGF in male breast cancer. *Oncotarget*, *7*(28), 43188-43198. doi:10.18632/oncotarget.9668
11. Dunlap, K. A., Filant, J., Hayashi, K., Rucker, E. B., 3rd, Song, G., Deng, J. M., . . . Spencer, T. E. (2011). Postnatal deletion of Wnt7a inhibits uterine gland morphogenesis and compromises adult fertility in mice. *Biol Reprod*, *85*(2), 386-396. doi:10.1095/biolreprod.111.091769

12. Elbjairami, W. M., Truong, L. D., Tawil, A., Wang, W., Dawson, S., Lan, H. Y., . . . Wayne Smith, C. (2010). Early differential expression of oncostatin M in obstructive nephropathy. *J Interferon Cytokine Res*, *30*(7), 513-523. doi:10.1089/jir.2009.0105
13. Eyden, B. (2008). The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med*, *12*(1), 22-37. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00213.x
14. Farah, O., Biechele, S., Rossant, J., & Dufort, D. (2017). Porcupine-dependent Wnt signaling controls stromal proliferation and endometrial gland maintenance through the action of distinct WNTs. *Dev Biol*, *422*(1), 58-69. doi:10.1016/j.ydbio.2016.11.023
15. Franco, H. L., Dai, D., Lee, K. Y., Rubel, C. A., Roop, D., Boerboom, D., . . . DeMayo, F. J. (2011). WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse. *FASEB J*, *25*(4), 1176-1187. doi:10.1096/fj.10-175349
16. Garrett, Q., Khaw, P. T., Blalock, T. D., Schultz, G. S., Grotendorst, G. R., & Daniels, J. T. (2004). Involvement of CTGF in TGF-beta1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *45*(4), 1109-1116.
17. Gerarduzzi, C., & Di Battista, J. A. (2017). Myofibroblast repair mechanisms post-inflammatory response: a fibrotic perspective. *Inflamm Res*, *66*(6), 451-465. doi:10.1007/s00011-016-1019-x
18. Gomez, I. G., Roach, A. M., Nakagawa, N., Amatucci, A., Johnson, B. G., Dunn, K., . . . Duffield, J. S. (2016). TWEAK-Fn14 Signaling Activates Myofibroblasts to Drive Progression of Fibrotic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*, *27*(12), 3639-3652. doi:10.1681/asn.2015111227
19. Grannas, K., Arngarden, L., Lonn, P., Mazurkiewicz, M., Blokzijl, A., Zieba, A., & Soderberg, O. (2015). Crosstalk between Hippo and TGFbeta: Subcellular Localization of YAP/TAZ/Smad Complexes. *J Mol Biol*, *427*(21), 3407-3415. doi:10.1016/j.jmb.2015.04.015
20. Grotendorst, G. R., Rahmanie, H., & Duncan, M. R. (2004). Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J*, *18*(3), 469-479. doi:10.1096/fj.03-0699com

21. Heallen, T., Zhang, M., Wang, J., Bonilla-Claudio, M., Klysik, E., Johnson, R. L., & Martin, J. F. (2011). Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science*, 332(6028), 458-461. doi:10.1126/science.1199010
22. Hernandez Gifford, J. A., Hunzicker-Dunn, M. E., & Nilson, J. H. (2009). Conditional deletion of beta-catenin mediated by Amhr2cre in mice causes female infertility. *Biol Reprod*, 80(6), 1282-1292. doi:10.1095/biolreprod.108.072280
23. Jamin, S. P., Arango, N. A., Mishina, Y., Hanks, M. C., & Behringer, R. R. (2002). Requirement of Bmpr1a for Müllerian duct regression during male sexual development. *Nat Genet*, 32(3), 408-410. doi:10.1038/ng1003
24. Jeyasuria, P., Ikeda, Y., Jamin, S. P., Zhao, L., De Rooij, D. G., Themmen, A. P., . . . Parker, K. L. (2004). Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Mol Endocrinol*, 18(7), 1610-1619. doi:10.1210/me.2003-0404
25. Klingberg, F., Hinz, B., & White, E. S. (2013). The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *The Journal of pathology*, 229(2), 298-309. doi:10.1002/path.4104
26. Lee, D. H., Park, J. O., Kim, T. S., Kim, S. K., Kim, T. H., Kim, M. C., . . . Lim, D. S. (2016). LATS-YAP/TAZ controls lineage specification by regulating TGFbeta signaling and Hnf4alpha expression during liver development. *Nat Commun*, 7, 11961. doi:10.1038/ncomms11961
27. Lenga, Y., Koh, A., Perera, A. S., McCulloch, C. A., Sodek, J., & Zohar, R. (2008). Osteopontin expression is required for myofibroblast differentiation. *Circ Res*, 102(3), 319-327. doi:10.1161/circresaha.107.160408
28. Lipson, K. E., Wong, C., Teng, Y., & Spong, S. (2012). CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 5(Suppl 1), S24. doi:10.1186/1755-1536-5-s1-s24
29. Liu, T., Liu, Y., Gao, H., Meng, F., Yang, S., & Lou, G. (2013). Clinical significance of yes-associated protein overexpression in cervical carcinoma: the differential effects based on histotypes. *Int J Gynecol Cancer*, 23(4), 735-742. doi:10.1097/IGC.0b013e31828c8619

30. Liu, Y., Liu, H., Meyer, C., Li, J., Nadalin, S., Konigsrainer, A., . . . ten Dijke, P. (2013). Transforming growth factor-beta (TGF-beta)-mediated connective tissue growth factor (CTGF) expression in hepatic stellate cells requires Stat3 signaling activation. *J Biol Chem*, *288*(42), 30708-30719. doi:10.1074/jbc.M113.478685
31. Lv, X. B., Liu, C. Y., Wang, Z., Sun, Y. P., Xiong, Y., Lei, Q. Y., & Guan, K. L. (2015). PARD3 induces TAZ activation and cell growth by promoting LATS1 and PP1 interaction. *EMBO Rep*, *16*(8), 975-985. doi:10.15252/embr.201439951
32. Mauviel, A., Nallet-Staub, F., & Varelas, X. (2012). Integrating developmental signals: a Hippo in the (path)way. *Oncogene*, *31*(14), 1743-1756. doi:10.1038/onc.2011.363
33. McNeill, H., & Reginensi, A. (2017). Lats1/2 Regulate Yap/Taz to Control Nephron Progenitor Epithelialization and Inhibit Myofibroblast Formation. *J Am Soc Nephrol*, *28*(3), 852-861. doi:10.1681/asn.2016060611
34. Mericskay, M., Kitajewski, J., & Sassoon, D. (2004). Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. *Development*, *131*(9), 2061-2072. doi:10.1242/dev.01090
35. Miesfeld, J. B., Gestri, G., Clark, B. S., Flinn, M. A., Poole, R. J., Bader, J. R., . . . Link, B. A. (2015). Yap and Taz regulate retinal pigment epithelial cell fate. *Development (Cambridge, England)*, *142*(17), 3021-3032. doi:10.1242/dev.119008
36. Mifflin, R. C., Saada, J. I., Di Mari, J. F., Adegboyega, P. A., Valentich, J. D., & Powell, D. W. (2002). Regulation of COX-2 expression in human intestinal myofibroblasts: mechanisms of IL-1-mediated induction. *Am J Physiol Cell Physiol*, *282*(4), C824-834. doi:10.1152/ajpcell.00388.2001
37. Nguyen, Q., Anders, R. A., Alpini, G., & Bai, H. (2015). Yes-associated protein in the liver: Regulation of hepatic development, repair, cell fate determination and tumorigenesis. *Dig Liver Dis*, *47*(10), 826-835. doi:10.1016/j.dld.2015.05.011
38. Nightingale, J., Patel, S., Suzuki, N., Buxton, R., Takagi, K. I., Suzuki, J., . . . Zhang, Z. (2004). Oncostatin M, a cytokine released by activated mononuclear cells, induces epithelial cell-myofibroblast transdifferentiation via Jak/Stat pathway activation. *J Am Soc Nephrol*, *15*(1), 21-32.
39. Parada, C., Li, J., Iwata, J., Suzuki, A., & Chai, Y. (2013). CTGF mediates Smad-dependent transforming growth factor β signaling to regulate mesenchymal cell

- proliferation during palate development. *Molecular and Cellular Biology*, 33(17), 3482-3493. doi:10.1128/MCB.00615-13
40. Park, H. W., Kim, Y. C., Yu, B., Moroishi, T., Mo, J. S., Plouffe, S. W., . . . Guan, K. L. (2015). Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ. *Cell*, 162(4), 780-794. doi:10.1016/j.cell.2015.07.013
41. Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Skovorodkin, I., Xu, Q., Miinalainen, I., Shan, J., & Vainio, S. J. (2016). Wnt4 coordinates directional cell migration and extension of the Mullerian duct essential for ontogenesis of the female reproductive tract. *Hum Mol Genet*, 25(6), 1059-1073. doi:10.1093/hmg/ddv621
42. Rachfal, A. W., & Brigstock, D. R. (2003). Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatol Res*, 26(1), 1-9.
43. Reginensi, A., Enderle, L., Gregorieff, A., Johnson, R. L., Wrana, J. L., & McNeill, H. (2016). A critical role for NF2 and the Hippo pathway in branching morphogenesis. *Nature Communications*, 7, 12309. doi:10.1038/ncomms12309
<https://www.nature.com/articles/ncomms12309#supplementary-information>
44. 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 Interdiscip Rev Dev Biol*, 7(3), e310. doi:10.1002/wdev.310
45. Sakai, N., Nakamura, M., Lipson, K. E., Miyake, T., Kamikawa, Y., Sagara, A., . . . Wada, T. (2017). Inhibition of CTGF ameliorates peritoneal fibrosis through suppression of fibroblast and myofibroblast accumulation and angiogenesis. *Scientific Reports*, 7(1), 5392. doi:10.1038/s41598-017-05624-2
46. Sasaki, H. (2017). Roles and regulations of Hippo signaling during preimplantation mouse development. *Development, Growth & Differentiation*, 59(1), 12-20. doi:10.1111/dgd.12335
47. Sobral, L. M., Bufalino, A., Lopes, M. A., Graner, E., Salo, T., & Coletta, R. D. (2011). Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A. *Oral Oncol*, 47(9), 840-846. doi:10.1016/j.oraloncology.2011.06.011
48. Song, Y., Fu, J., Zhou, M., Xiao, L., Feng, X., Chen, H., & Huang, W. (2016). Activated Hippo/Yes-Associated Protein Pathway Promotes Cell Proliferation and Anti-apoptosis

- in Endometrial Stromal Cells of Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 101(4), 1552-1561. doi:10.1210/jc.2016-1120
49. St-Jean, G., Boyer, A., Zamberlam, G., Godin, P., Paquet, M., & Boerboom, D. (2019). Targeted ablation of Wnt4 and Wnt5a in Mullerian duct mesenchyme impedes endometrial gland development and causes partial Mullerian agenesis. *Biol Reprod*, 100(1), 49-60. doi:10.1093/biolre/iy0160
50. Strakova, Z., Reed, J., & Ihnatovych, I. (2010). Human transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) is downregulated during decidualization. *Biol Reprod*, 82(6), 1112-1118. doi:10.1095/biolreprod.109.081844
51. Svotelis, A., Gévry, N., & Gaudreau, L. (2009). Chromatin Immunoprecipitation in Mammalian Cells. *Leblanc B., Moss T. (eds) DNA-Protein Interactions. Methods in Molecular Biology™ (Methods and Protocols) Humana Press, 543.*
52. Szeto, S. G., Narimatsu, M., Lu, M., He, X., Sidiqi, A. M., Tolosa, M. F., . . . Yuen, D. A. (2016). YAP/TAZ Are Mechanoregulators of TGF-beta-Smad Signaling and Renal Fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol*, 27(10), 3117-3128. doi:10.1681/asn.2015050499
53. Teixeira, J., He, W. W., Shah, P. C., Morikawa, N., Lee, M. M., Catlin, E. A., . . . Donahoe, P. K. (1996). Developmental expression of a candidate mullerian inhibiting substance type II receptor. *Endocrinology*, 137(1), 160-165. doi:10.1210/endo.137.1.8536608
54. Tian, J., Yang, F., & Liu, H. (2012, 28-30 May 2012). *TGF-Beta and CTGF Mediated Signal Transduction Pathway and Fibrosis*. Paper presented at the 2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology.
55. Tsoi, M., Morin, M., Rico, C., Johnson, R. L., Paquet, M., Gevry, N., & Boerboom, D. (2019). Lats1 and Lats2 are required for ovarian granulosa cell fate maintenance. *FASEB J*, fj201900609R. doi:10.1096/fj.201900609R
56. Tsutsumi, R., Masoudi, M., Takahashi, A., Fujii, Y., Hayashi, T., Kikuchi, I., . . . Hatakeyama, M. (2013). YAP and TAZ, Hippo Signaling Targets, Act as a Rheostat for Nuclear SHP2 Function. *Dev Cell*, 26(6), 658-665. doi:<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.08.013>

57. Vainio, S., Heikkila, M., Kispert, A., Chin, N., & McMahon, A. P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, *397*(6718), 405-409. doi:10.1038/17068
58. Varelas, X., Miller, B. W., Sopko, R., Song, S., Gregorieff, A., Fellouse, F. A., . . . Attisano, L. (2010). The Hippo pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Dev Cell*, *18*(4), 579-591. doi:10.1016/j.devcel.2010.03.007
59. Yang, Z., Sun, Z., Liu, H., Ren, Y., Shao, D., Zhang, W., . . . Nie, S. (2015). Connective tissue growth factor stimulates the proliferation, migration and differentiation of lung fibroblasts during paraquat-induced pulmonary fibrosis. *Mol Med Rep*, *12*(1), 1091-1097. doi:10.3892/mmr.2015.3537
60. 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
61. Zhan, M., Ikeda, J. I., Wada, N., Hori, Y., Nojima, S., Tahara, S. I., . . . Morii, E. (2016). Prognostic significance of a component of the Hippo pathway, TAZ, in human uterine endometrioid adenocarcinoma. *Oncol Lett*, *11*(6), 3611-3616. doi:10.3892/ol.2016.4483
62. 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 Dev*, *21*(21), 2747-2761. doi:10.1101/gad.1602907
63. 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 Dev*, *22*(14), 1962-1971. doi:10.1101/gad.1664408
64. 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

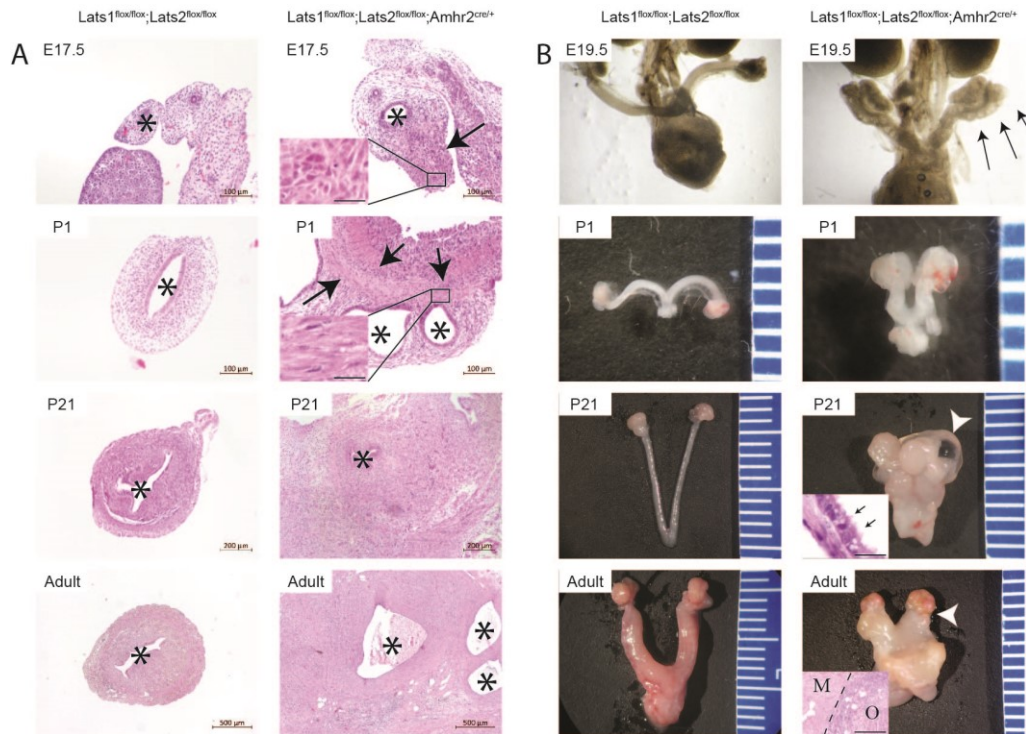


Figure 1. Loss of Hippo signaling result in severe developmental defects of the female reproductive tract.

(A). Representative photomicrographs of the reproductive tracts of E17.5, P1, P21 and adult female mice of the indicated genotypes. In E17.5 mutant mice, the antimesometrial portion of the Müllerian mesenchyme is replaced by abnormal cells with abundant, slightly eosinophilic cytoplasm (black arrow and inset). The abnormal cell population shows clear signs of differentiation in P1 mutant mice (black arrows and inset), unlike the control. P21 and adult mutant mice show loss of normal architecture of the uterine layers. Müllerian duct and uterine lumens are identified with (*). Stain = Hematoxylin-eosin-phloxine (HE). (B). Representative photographs of the dissected reproductive tracts of E19.5, P1, P21 and adult female mice of the indicated genotypes. E19.5 mutant mice showed abnormal elongation and coiling of the Müllerian ducts (black arrow). Dilatation of oviduct is visible in P21 mutant mice (white arrowhead). Inset shows the dilated oviduct wall with the characteristic ciliated epithelium. In adults, the oviduct is absent and the ovary is adhered directly to the uterine horn (white arrowhead and inset). M=myometrium/smooth muscle, O=ovary. Ruler graduations are in millimeters. Scale bars in insets are 20µm, except inset in the mutant adult uterus (bar = 200µm).

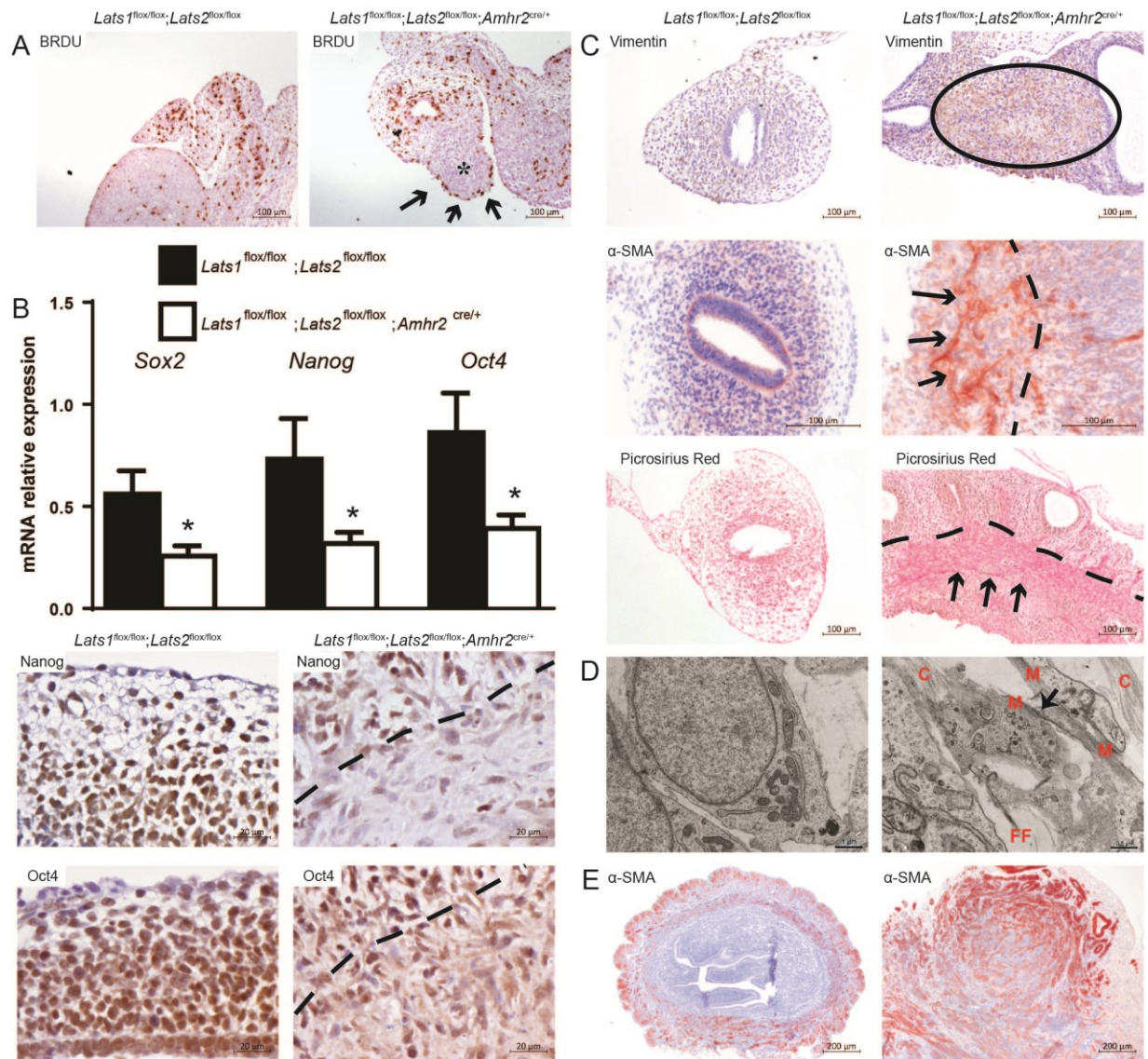


Figure 2. Loss of Hippo signaling causes Müllerian mesenchyme cells to commit to the myofibroblast fate.

(A). BrdU incorporation assays show proliferation in the coelomic epithelium (black arrows) in the vicinity of (but not within) the altered Müllerian mesenchyme (*) in mutant mice at E17.5. (B). Graph: RT-qPCR of pluripotency markers (*Sox2*, *Nanog*, *Oct4*) in the uteri of P1 mice of the indicated genotypes (n=6). Data are presented as means (columns) \pm s.e.m (error bars). Asterisks (*) = statistically significant from controls (P<0.05, Student's t-test). Lower panels: immunohistochemistry analyses of NANOG and OCT4 in the same samples. Dashed line marks the boundary between normal (above) and abnormal (below) cell populations in the mutant group. (C). Immunohistochemistry analyses of vimentin and α -SMA expression in the uteri of

P1 mice of the indicated genotypes. Note the positive signal within the abnormal cell population (black circle and black arrows). Picrosirius red shows an abundance of collagen fibers (stained in red) in the altered tissues of the mutant group (black arrows). (D). Transmission electron microscopy analyses of uteri of P1 mice of the indicated genotypes. C=collagen bundle, M=peripheral myofilaments, FF=extracellular fibrils, arrow=fibronexus junction. Scale bar for control=1 μ m, mutant=0.5 μ m. (E). Immunohistochemistry analyses of α -SMA expression in the uteri of adult mice of the indicated genotypes.

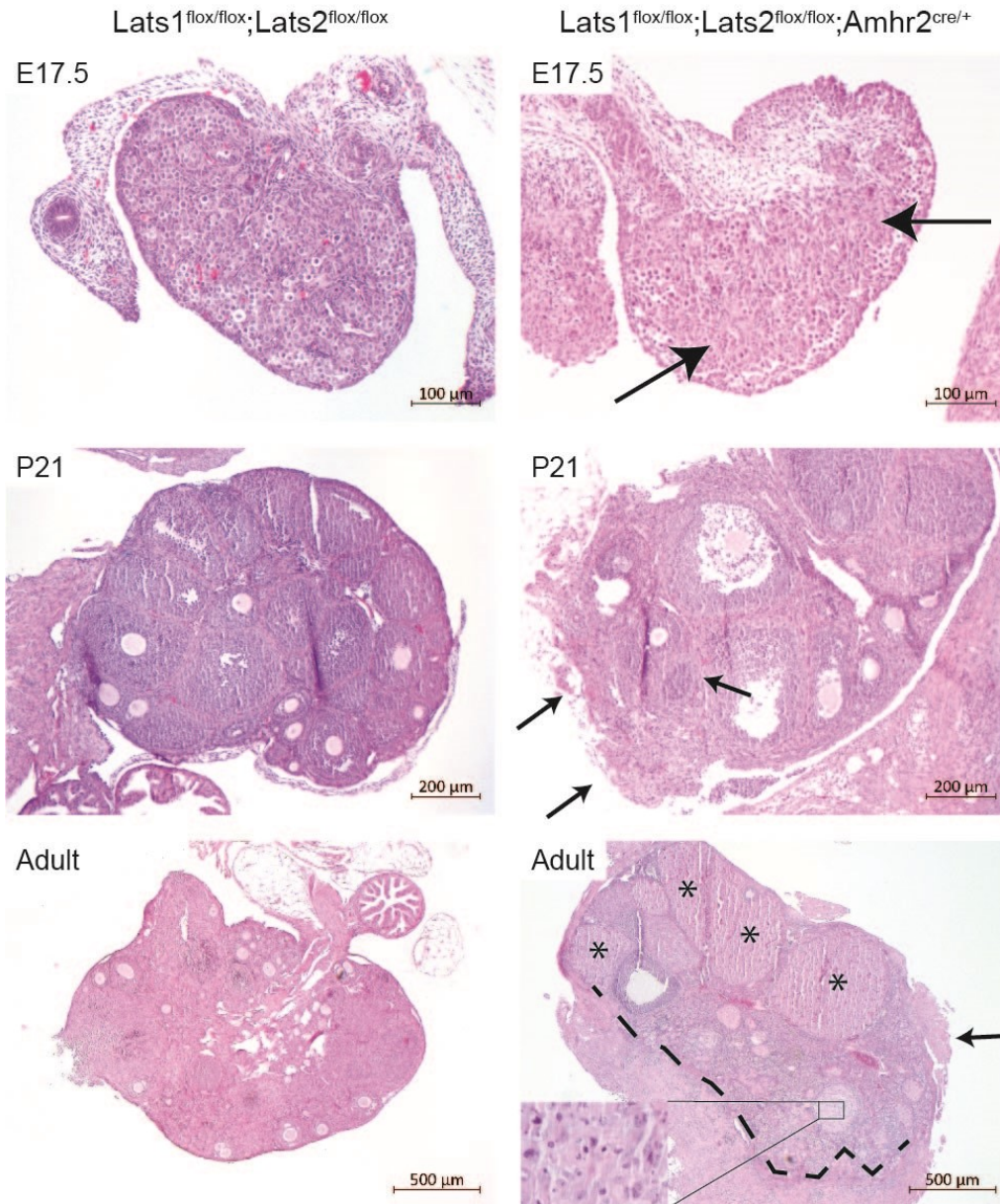


Figure 3. Ovarian phenotypic changes in *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} mice. (A). Photomicrographs of ovaries from E17.5, P21 and adult mice of the indicated genotypes. In mutant mice, stromal changes were observed as early as E17.5 (black arrow) and expanded beyond the surface of the ovary at P21 (black arrow). In adult mutant mice, the ovary was covered by a cell population suggestive of an ovarian surface epithelium neoplasm (black arrows, delineated by dashed line). Loss of granulosa cell differentiation was observed within some follicles (inset). Corpora lutea are indicated with asterisks (*). Stain = Hematoxylin-eosin-phloxine (HE).

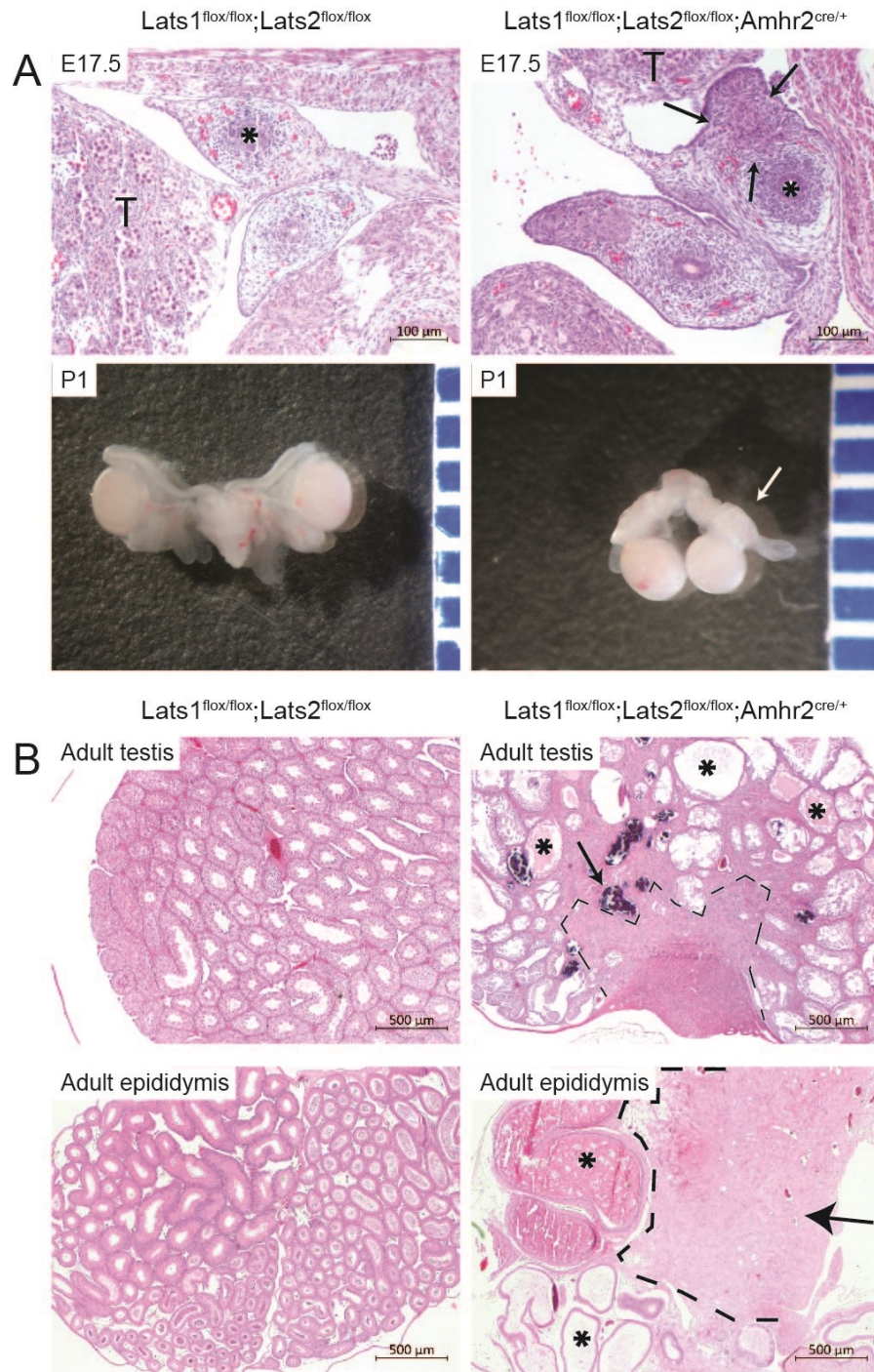


Figure 4. Reproductive tract and testicular defects in male *Lats1^{flox/flox}; Lats2^{flox/flox}; Amhr2^{cre/+}* mice.

(A). Photomicrographs (E17.5) and photographs (P1) of reproductive tracts of mice of the indicated genotypes. Note the persistent Müllerian tissue (between black arrows and dashed line) in the vicinity of the Wolffian duct (*) in E17.5 mutant mice. T=Testis. Stain =

Hematoxylin-eosin-phloxine (HE). Photograph at P1 shows ectopically positioned epididymides and deferent ducts in mutant mice (white arrow). Ruler graduations are in millimeters. (B). Photomicrographs of testes and epididymides of adult mice of the indicated genotypes. Morphological changes associated with obstruction and cryptorchidism are evident in the testes of mutant mice. Seminiferous tubules are often dilated by eosinophilic material (cellular debris) (*), degenerated and occasionally mineralized (black arrow). Foci of ectopic myofibroblasts are present in the mediastinum/rete testis (delineated by black dashed line) and within the epididymis of the mutant mice (delineated by black dashed line and black arrow), resulting in mechanical obstruction and dilation of the ducts (*). Stain = Hematoxylin-eosin-phloxine (HE).

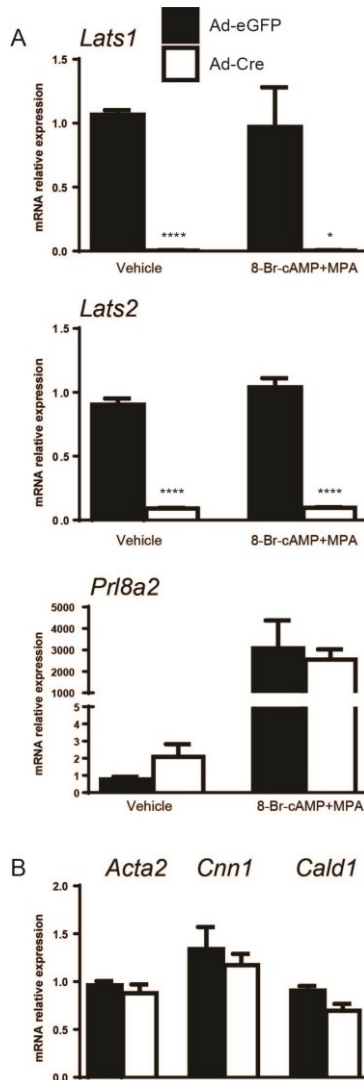


Figure 5. Loss of Hippo signaling does not alter decidualization or cell fate in adult endometrial stromal cells.

(A). RT-qPCR analysis of *Lats1*, *Lats2* and decidual prolactin (*Prl8a2*) mRNA levels in cultured uterine endometrial stromal cells from *Lats1*^{flx/flx}; *Lats2*^{flx/flx} mice following 24h treatment with Ad-Cre or Ad-eGFP, and 3 days of co-culture with epithelial cells and treatment with cAMP + medroxyprogesterone (or vehicle control). (B). mRNA levels of myofibroblast/muscle markers in samples similar to those shown in A, but omitting co-culture with endothelial cells. Data presented are means (columns) \pm s.e.m (error bars). Columns labeled with asterisks are statistically significant from controls (*=P<0.05, **** = P<0.0001, analyzed by Student's t-test, n=3).

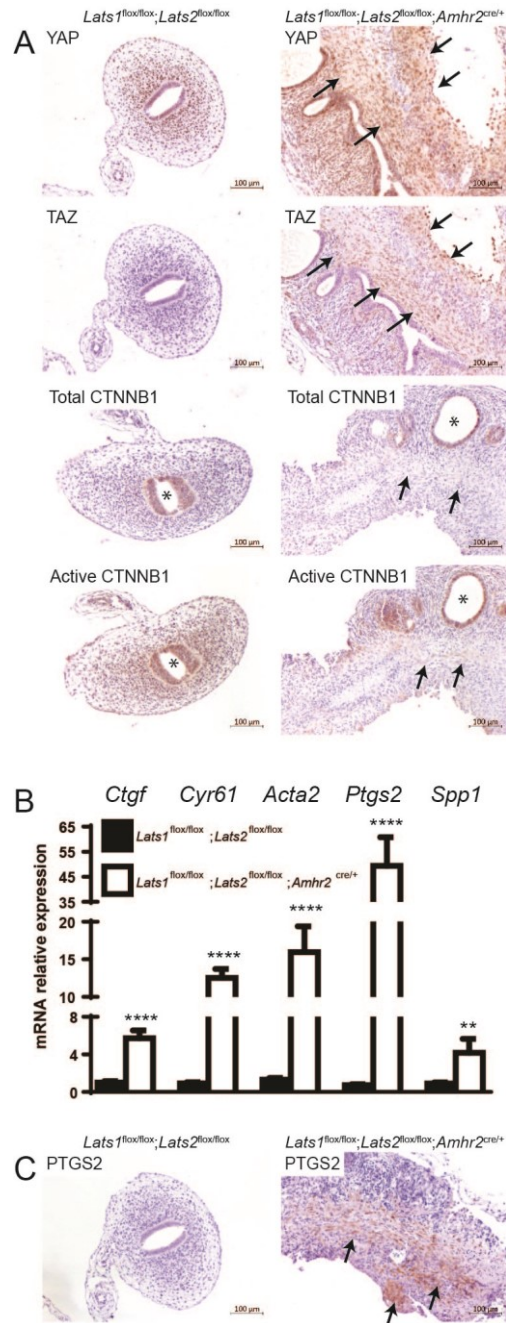


Figure 6. YAP/TAZ-dependent induction of Hippo target genes and the myofibroblast genetic program in female *Lats1^{flox/flox}; Lats2^{flox/flox}; Amhr2^{cre/+}* mice.

(A). Immunohistochemistry analyses of YAP, TAZ, total CTNNB1 and active CTNNB1 expression in uteri of P1 mice of the indicated genotypes. For YAP and TAZ, arrows indicate increased cytoplasmic and nuclear staining in the ectopic myofibroblast cell population in mutant mice. For total CTNNB1 and active CTNNB1, arrows indicate low expression in the

ectopic myofibroblast cell population. * = uterine lumen. (B). RT-qPCR analyses of Hippo pathway target genes (*Ctgf*, *Cyr61* at P1) and myofibroblast-associated genes (*Acta2*, *Ptgs2*, *Spp1* at E17.5). Data are means (columns) \pm s.e.m (error bars). Columns labeled with asterisks are statistically significant from controls (**=P<0.01, **** = P<0.0001, Student's t-test, n = 6/genotype). (C). Immunohistochemistry analyses of PTGS2 expression in the Müllerian ducts of E17.5 mice of the indicated genotypes. Staining was limited to the ectopic myofibroblast cell population in mutant mice (black arrow).

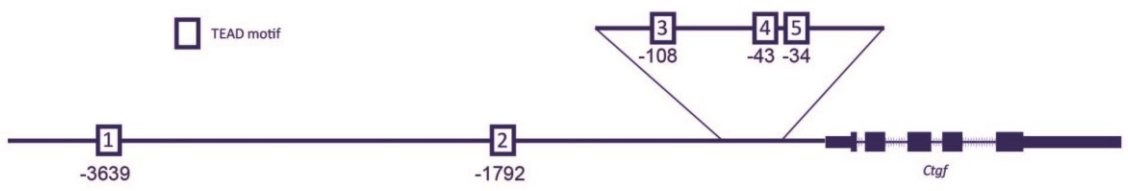
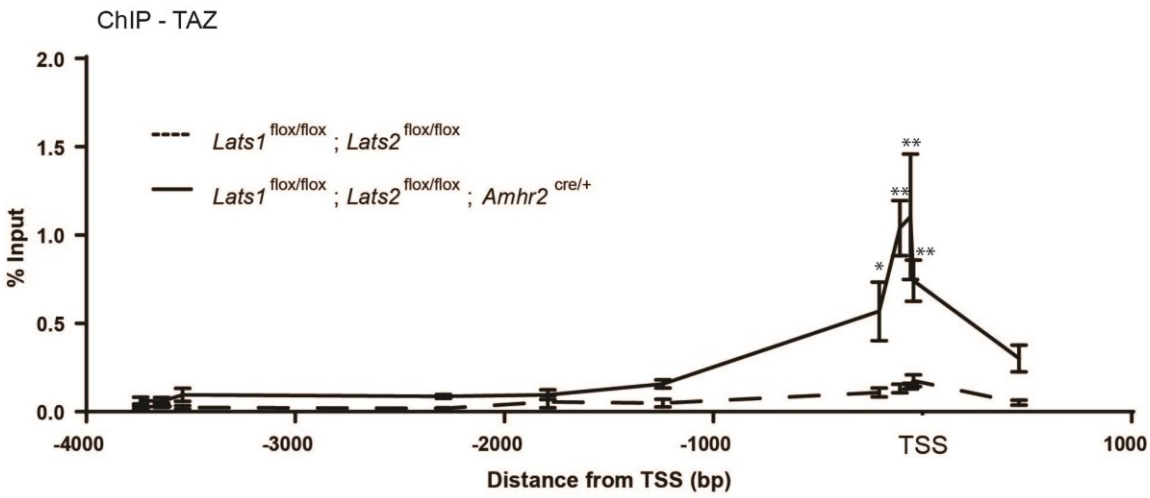
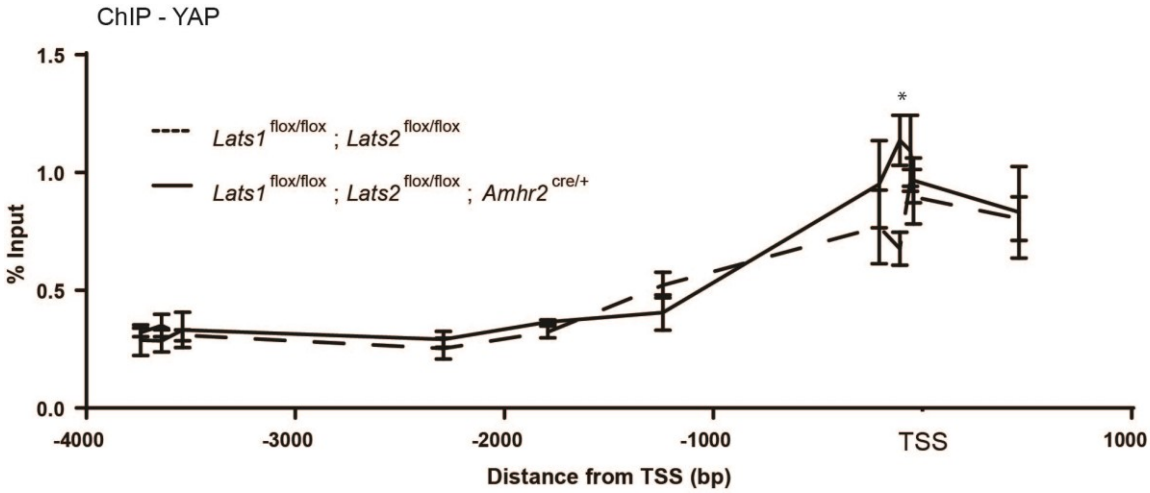
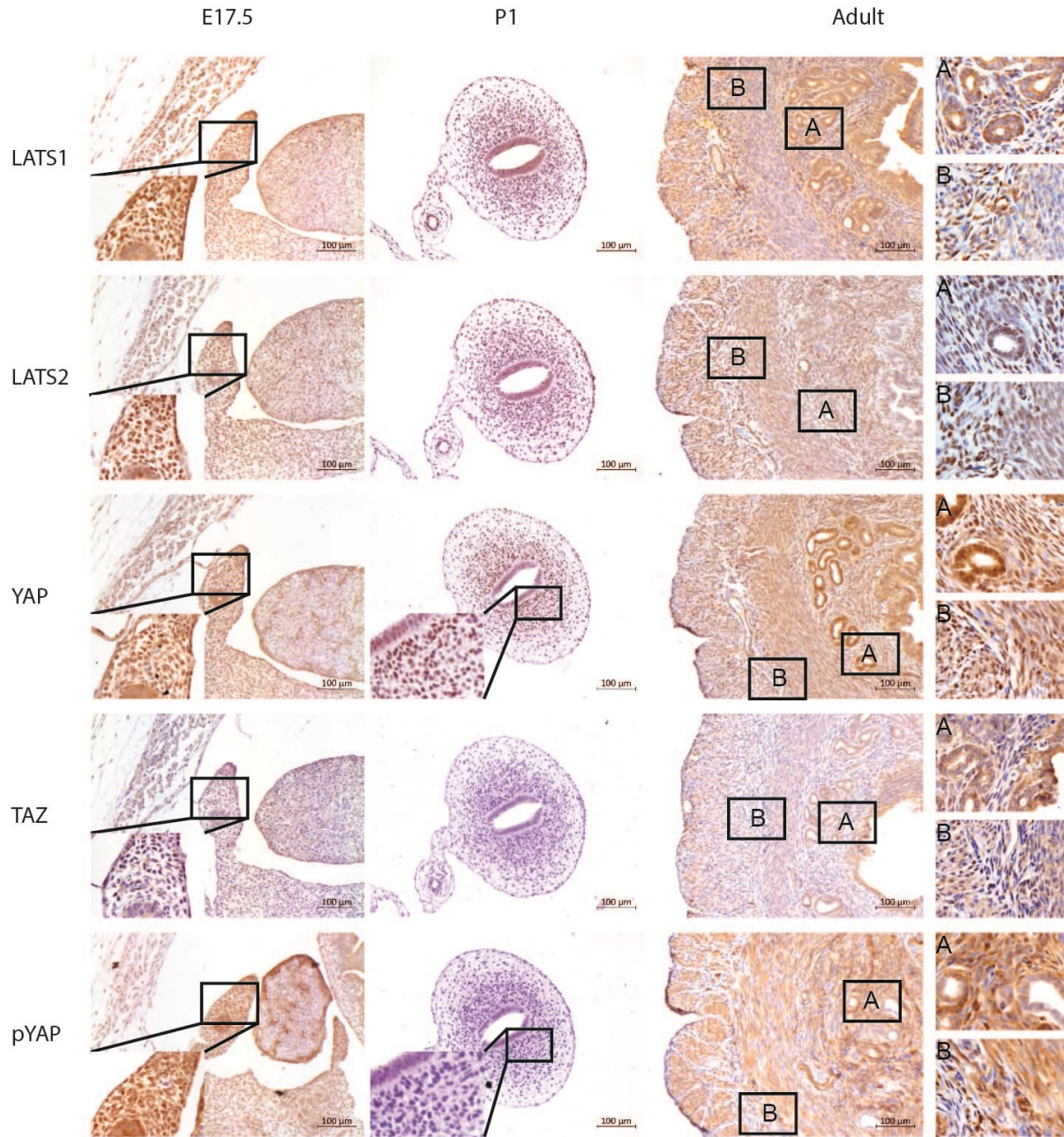
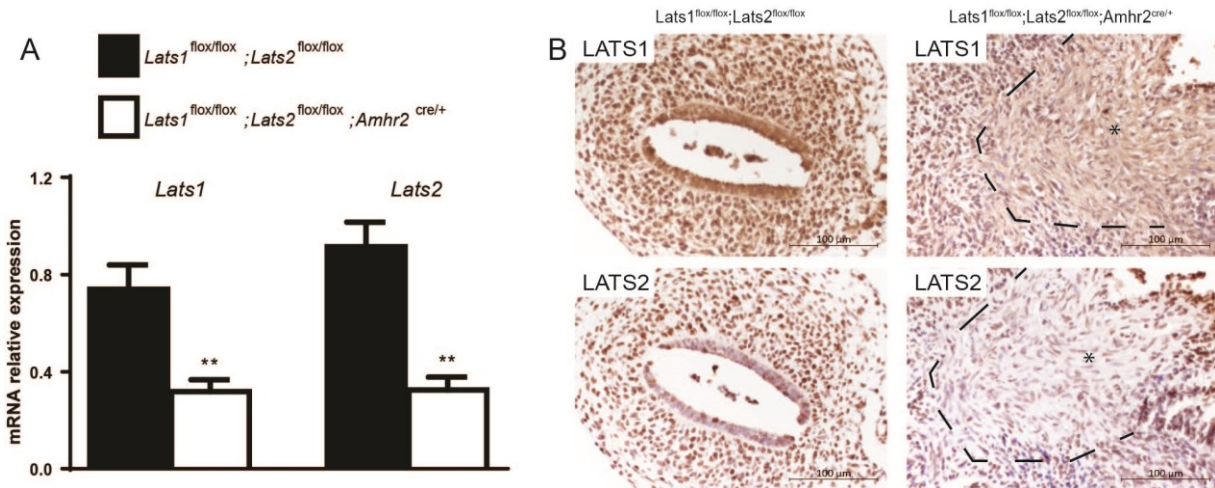


Figure 7. Chromatin immunoprecipitation analyses.

ChIP-qPCR was performed using uteri from P1 *Lats1*^{flx/flx}; *Lats2*^{flx/flx}; *Amhr2*^{cre/+} (mutant) mice or *Lats1*^{flx/flx}; *Lats2*^{flx/flx} (control) mice to evaluate the enrichment of YAP and TAZ on the *Ctgf* promoter. N=4 biological replicates/genotype. Analyzed by two-way ANOVA. Data are presented as means (points) ± s.e.m (error bars). Points labeled with asterisks are statistically significant from controls (*=P<0.01, ** = P<0.0001).

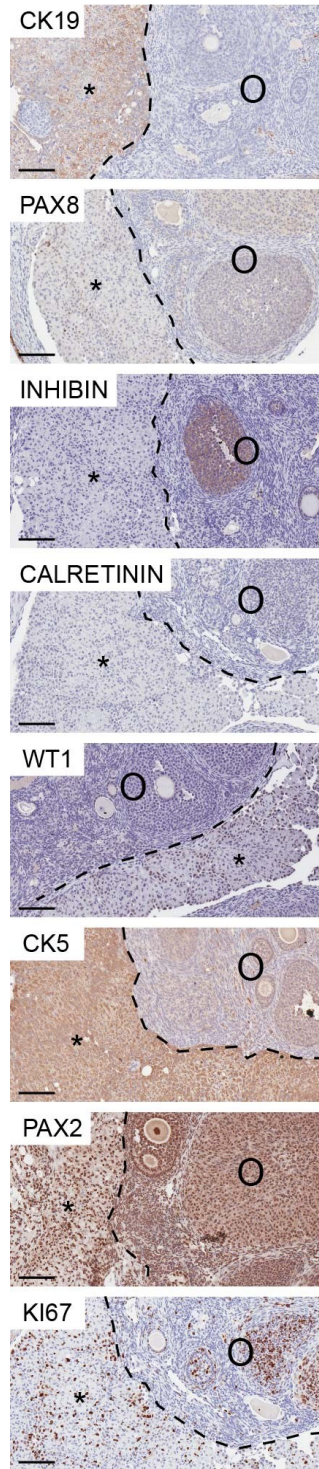


Supplemental figure 1. Immunohistochemical analyses of Hippo core component (LATS1, LATS2, YAP, TAZ, phosphoYAP) expression during female reproductive tract development.



Supplemental figure 2. Evaluation of knockout efficiency in the female $Lats1^{flox/flox}; Lats2^{flox/flox}; Amhr2^{cre/+}$ reproductive tract.

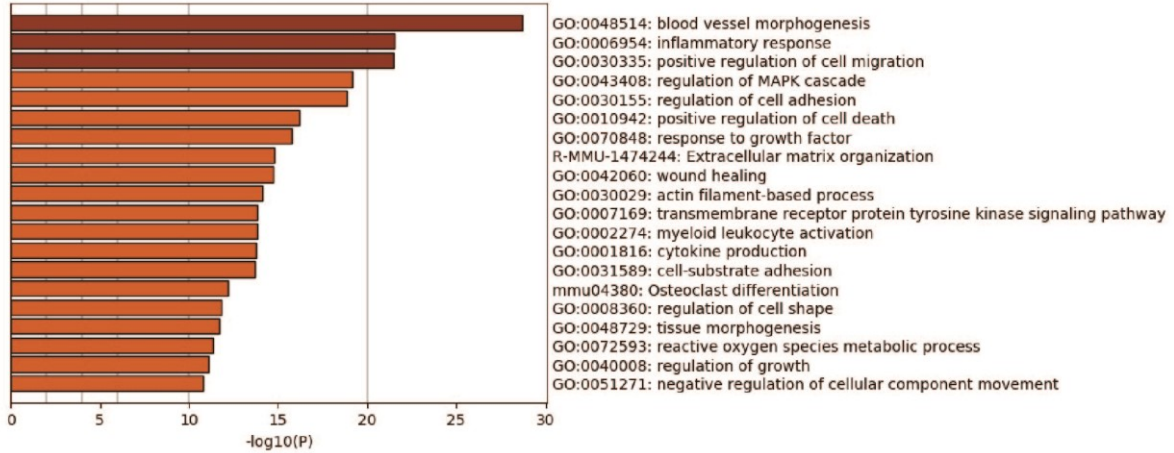
(A). RT-qPCR analysis of *Lats1* and *Lats2* mRNA levels in Müllerian ducts from E17.5 mutant mice of the indicated genotypes. Data are presented as means (columns) \pm s.e.m (error bars). Columns labeled with asterisks are statistically significantly different from controls (**= $P < 0.01$, $n = 4$, Student's t-test). (B). Immunohistochemistry analysis of LATS1 and LATS2 expression in uteri from P1 mice of the indicated genotypes. The ectopic myofibroblast cell population is delineated with a black dashed line. Apparent residual LATS1 and LATS2 staining in the myofibroblast population in the Müllerian ducts of $Lats1^{flox/flox}; Lats2^{flox/flox}; Amhr2^{cre/+}$ mice represents background signal.



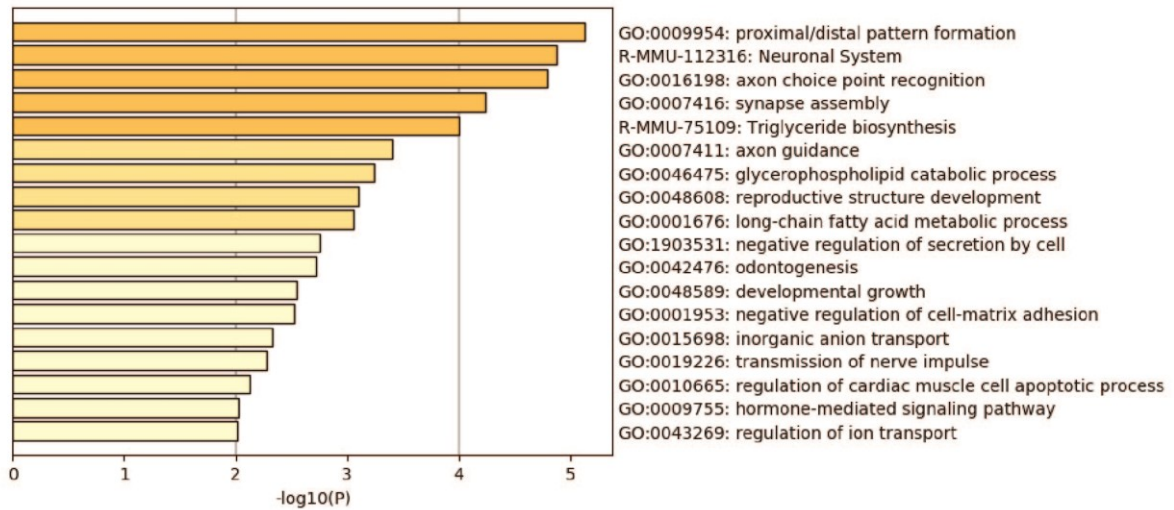
Supplemental figure 3. Representative tumor marker immunohistochemistry photomicrographs.

O = ovary, * = neoplastic tissue. Bars = 100 μ M.

A Biological processes associated with upregulated genes in Müllerian ducts of *Lats1^{flox/flox}*; *Lats2^{flox/flox}*; *Amhr2^{cre/+}* mice



B Biological processes associated with downregulated genes in Müllerian ducts of *Lats1^{flox/flox}*; *Lats2^{flox/flox}*; *Amhr2^{cre/+}* mice



Supplemental figure 4. Microarray gene ontology analysis

(A). Biological processes associated with genes upregulated in the uteri of *Lats1^{flox/flox}*; *Lats2^{flox/flox}*; *Amhr2^{cre/+}* mice relative to controls. (B). Biological processes associated with genes downregulated in the uteri of *Lats1^{flox/flox}*; *Lats2^{flox/flox}*; *Amhr2^{cre/+}* mice relative to controls. All results were obtained using Metascape (<http://metascape.org>) (Y. Zhou et al., 2019).

TABLE 1. Microarray; top 20 upregulated genes in *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} female mice

Gene	Fold change	P-value
<i>Ptgs2</i>	151.81	1.87E-09
<i>Tac2</i>	50.41	5.32E-08
<i>Spp1</i>	43.74	1.22E-07
<i>Serpib7</i>	33.18	7.12E-08
<i>Cyr61</i>	20.48	3.79E-08
<i>Slc2a3</i>	19.62	3.08E-09
<i>Inhba</i>	18.84	7.24E-10
<i>Osmr</i>	18.59	5.34E-08
<i>Ccl12</i>	16.21	2.27E-07
<i>Tnfrsf12a</i>	15.39	1.36E-08
<i>Rcan2</i>	15.38	5.15E-08
<i>Lcn2</i>	15.34	0.0240
<i>Bhlhe40</i>	14.91	7.18E-09
<i>Bmp4</i>	14.19	6.90E-07
<i>Gadd45g</i>	14.12	2.56E-08
<i>Plaur</i>	12.68	3.12E-09
<i>Ankrd1</i>	12.6	3.26E-06
<i>Ctgf</i>	12.14	2.51E-08
<i>Gpr50</i>	11.89	0.0001
<i>Fam180a</i>	10.9	6.90E-07

TABLE 2. Microarray; top 20 downregulated genes in *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Amhr2*^{cre/+} female mice

Gene	Fold change	P-value
<i>Amhr2</i>	-14.29	9.07E-08
<i>Robo2</i>	-7.71	7.94E-06
<i>Grial</i>	-7.33	2.82E-07
<i>Retnlg</i>	-7.02	2.59E-07
<i>Gstm7</i>	-6.77	0.0007
<i>Prdm1</i>	-5.78	0.0004
<i>Vsnl1</i>	-5.68	0.0020
<i>Gdpd3</i>	-5.11	0.0003
<i>Nr3c2</i>	-4.7	5.94E-06
<i>Stfa2</i>	-4.7	0.0008
<i>Synpo2</i>	-4.59	2.13E-05
<i>Mybpc1</i>	-4.34	4.26E-05
<i>Gm9912</i>	-3.9	0.0001
<i>Tex15</i>	-3.77	6.00E-06
<i>Epha6</i>	-3.71	0.0345
<i>Enpp2</i>	-3.7	7.99E-06
<i>Tcf24</i>	-3.69	0.0485
<i>Stfa211</i>	-3.68	0.0015
<i>Slc14a1</i>	-3.51	0.0011
<i>Plekhs1</i>	-3.48	0.0029

SUPPLEMENTAL TABLE 1. Fertility trial.

Genotype	n	Total litters	Total pups	Litter size
<i>Lats1</i> ^{flox/flox} ; <i>Lats2</i> ^{flox/flox}	7	7.57±0.30	67.29±5.06	8.88±0.37
<i>Lats1</i> ^{flox/flox} ; <i>Amhr2</i> ^{cre/+}	6	7.86±0.14	60.86±4.90	7.75±0.46
<i>Lats2</i> ^{flox/flox} ; <i>Amhr2</i> ^{cre/+}	6	7.83±0.17	55.33±4.36	7.06±0.34
<i>Lats1</i> ^{flox/flox} ; <i>Lats2</i> ^{flox/flox} ; <i>Amhr2</i> ^{cre/+}	6	0.0±0.0****	0.0±0.0****	0.0±0.0****

Values are expressed as means ± SEM

**** Means are significantly different (P<0.0001)

SUPPLEMENTAL TABLE 2. Tumor marker immunohistochemistry analyses.

Marker	Signal strength
CK19	++
PAX8	+
INHIBIN	-
CALRETININ	-
WT1	+/-
CK5	+++
PAX2	++
KI67	+

SUPPLEMENTAL TABLE 3. qPCR primers

Gene	Forward	Reverse
<i>Acta2</i>	AGCCATCTTTCATTGGGATGG	CCCCTGACAGGACCTTGTTA
<i>Cald1</i>	GTTGCTGCCCTAGAGATAGTCA	AACCTTTGACTGTCCACCCC
<i>Cnn1</i>	TGCGCTTGTCTGTGTCATCT	TCTGGGCCAGCTTGTTCCTT
<i>Ctgf</i>	GAGGAAAACATTAAGAAGGGCAAAA	CCGCAGAACTTAGCCCTGTA
<i>Cyr61</i>	TTGACCAGACTGGCGCTCT	AGTTTTGCTGCAGTCCTCGT
<i>Lats1</i>	AGCAGCACGTAGAGAACGTC	TTCATTTGATCCTGGGCATCT
<i>Lats2</i>	TGCACTGGATTCAGGTGGACTCA	GAGAATGTGCCAGGCACCTCT
<i>Nanog</i>	ACCTGAGCTATAAGCAGGTTAAGA	TGAATCAGACCATTGCTAGTCTTC
<i>Oct4</i>	CCATGTTTCTGAAGTGCCCG	ACCATACTCGAACCACATCCTTC
<i>Prl8a2</i>	CTCACTTCTCAGGGGCACT	AGCCATTCTCTCCTGTTTGACA
<i>Ptgs2</i>	CCTGAAGCCGTACACATCATTGA	AGGCACTTGCATTGATGGTGGCT
<i>Rpl19</i>	CTGAAGGTCAAAGGGAATGTG	GGACAGAGTCTTGATGATCTC
<i>Sox2</i>	GCGGAGTGGAAACTTTTGTCC	CGGGAAGCGTGTACTTATCCTT
<i>Spp1</i>	CCTTGCTTGGGTTTGCAGTC	TGGTCGTAGTTAGTCCCTCAGA

SUPPLEMENTAL TABLE 4. ChIP primers

Position	Forward	Reverse
-3739	CAAACATCCATGCTTCCTTCCAA	TTAAGGAGTGTGCCCTCTCACA
-3639	TCTGGCATACGCCCCCTG	TGTGTCCTAGGTTTCAGTCATGT
-3539	TGCTGACAGCCCAGTGTATG	GTGGAACGTGACTCAAAGCC
-2292	CACAACGCATCTGTTTCCTG	CTCGATTTTCGTTGCTCTCAGTG
-1792	GCCTCTTCTCTTTGAGGAATGCT	GTGTGAGTGGCTTGAAGTGTG
-1242	ACAACACAGGTCCTAAATGAATG	GAAGTCTACTTAGTTTCTGTAAGG
-208	CAGAACTGGCAAAGAGATTTTTAAG	TCCATATCATCTTCTCACCCCTC
-108	GCGAGCTAAAGTGTGCCAG	TTGACACTCCACATTCCTCCG
-58	GTGTCAAGGGGTCAGGATCAA	CCACCTTCCTGCCTCATCAAC
-43	TGAGTTGATGAGGCAGGAAGG	CGCCAAAGAAGTGAATGGAGTC
462	GAAGTGTGTACGGAGCGTGAC	CAGAAGAGGCCCTTGTGTGGG

CHAPITRE 5. DISCUSSION

5.1 DISCUSSIONS GÉNÉRALES

5.1.1 Les limites du système cre-lox

L'utilisation de modèles transgéniques murins constitue un outil essentiel pour la génomique fonctionnelle (fonction et expression des gènes) et la biologie moléculaire (mécanismes cellulaires). Les premières techniques développées (piégeage et/ou ciblage de gènes) étaient caractérisées par l'inactivation d'un gène cible dans le génome de l'ensemble de l'organisme. Ces modèles sont toutefois caractérisés par diverses limitations. L'inactivation a lieu dès la fécondation chez les souris homozygotes, résultant parfois en mortalité embryonnaire entravant une étude fonctionnelle complète. Lorsque le modèle est viable, l'inactivation hâtive masque parfois certains rôles s'exprimant plus tardivement chez l'adulte.

Le système cre-lox, tel qu'utilisé dans ce projet, aide à contourner ces limitations en permettant une inactivation conditionnelle spatiotemporelle du gène d'intérêt. En résumé, le(s) gène(s) d'intérêt(s) est flanqué de séquences *loxP*. Ces séquences peuvent être reconnues par une enzyme recombinase spécifique (Cre). En présence de cette recombinase, le gène d'intérêt est excisé aux sites *loxP*. L'expression de la recombinase est habituellement couplée à un promoteur choisi pour ses aptitudes spatiotemporelles (expression dans un tissu ou cellules cibles à un moment relativement prédéterminé).

Le système cre-lox n'est pas infallible et quelques limitations ont été rapportées, dont certaines ont été rencontrées dans ce projet.

5.1.1.1 Fuite de la recombinase.

Il arrive, selon le promoteur cre utilisé, que la recombinase s'exprime de façon indésirée dans un type cellulaire différent à celui ciblé et peut donc mener à des résultats confondants. Le promoteur utilisé dans notre modèle, *Amhr2^{CRE}*, a déjà été rapporté dans certains modèles comme ayant possiblement fui (Hernandez Gifford et al., 2009). Dans le cas de nos deux projets, nous avons remarqué, lors du génotypage, que l'une des allèles de nos gènes d'intérêt était souvent invalidée dans les biopsies de queue. Cette recombinaison est d'autant plus importante qu'elle est observée dans l'ensemble de l'organisme. Ce phénomène a eu des conséquences diverses sur nos analyses, augmentant notamment le nombre de radets, de malformations rénales chez les souris Wnt et une augmentation de la prévalence de tumeurs cutanées chez les souris Hippo. La prévalence de ces anomalies semblait augmenter avec les

années. Il est possible, dans notre cas, que la recombinaise cre ait fuit dans les cellules germinales, expliquant ladite allèle invalidée. L'intégration de ces allèles invalidées a entraîné une dérive génétique dans les générations subséquentes. Cette dérive a eu des conséquences fâcheuses, notamment en limitant la fertilité de nos lignées et limitant le nombre d'individus expérimentaux récoltés (mortalité embryonnaire ?). Cette problématique peut aussi entraîner des limitations dans les analyses moléculaires. L'allèle affecté étant invalidé, il en résulte une diminution de sa transcription et ainsi une potentielle diminution de la quantité d'ARNm dans les organes affectés. L'impact demeure léger dans le cas des organes ciblés car l'invalidation y est désirée. Cette diminution de l'activité transcriptionnelle dans les organes hors cibles pourrait toutefois entraîner des altérations physiologiques contribuant au phénomène décrit précédemment.

La prévention de ce phénomène a été un défi de taille. Il a été nécessaire de sélectionner des couples reproducteurs pour lesquels aucun allèle invalidé n'était détecté. Toutefois, malgré les efforts investis, il n'a été possible que de repousser l'apparition du problème. La correction de ce dernier était difficilement envisageable car longue, coûteuse et fastidieuse. Une réinitialisation de la lignée de souris aurait pu être envisagée à long terme. Il aurait été nécessaire de débiter à partir d'une génération hybride F1 issue d'un mâle *Amhr2*^{CRE/+} et d'une femelle dont les gènes d'intérêt sont floxés.

Dans le cas de recombinaison hors cible, il aurait été possible d'évaluer l'expression de la recombinaise Cre (par exemple à l'aide d'immunohistochimie ou de lignées reporteurs) afin de déterminer les organes affectés. Cette approche n'a pas été effectuée dans notre cas car les phénotypes observés étaient convaincants et ciblés.

5.1.1.2 Toxicité de la recombinaise

Il a été rapporté, de façon anecdotique, qu'une accumulation intracellulaire accrue de recombinaise cre pouvait entraîner de la mort cellulaire ("Cre-recombinase-associated toxicity highlights limitations of genome editing," 2013). Une étude de Loonstra et al effectuée sur des lignées cellulaires fibroblastiques issues d'embryons de souris suggère un potentiel mécanisme expliquant cette toxicité. Une quantité excessive de recombinaise Cre inhibait la croissance cellulaire, entraînait une accumulation de cellules en phase G2/M ou ayant des anomalies chromosomales et pouvait provoquer des dommages à l'ADN malgré l'absence de régions clés

(séquences LoxP) (Loonstra et al., 2001). L'une des hypothèses expliquant ces dommages à l'ADN serait la présence de séquences LoxP équivoques dans le génome normal et pouvant être potentiellement reconnues par la recombinaise Cre (Schmidt, Taylor, Prigge, Barnett, & Capecchi, 2000; Semprini et al., 2007). Ce problème est toutefois peu fréquemment rencontré *in vivo*. Cela s'explique notamment par l'utilisation accrue de systèmes inductibles (tel tamoxifen) ou encore l'utilisation de souris hétérozygotes pour la recombinaise cre pouvant ainsi limiter la quantité de recombinaise produite par les cellules. Cela ne semble pas avoir été une source de problème dans notre cas, car nous avons utilisé des souris hétérozygotes pour la recombinaise cre. Avec du recul, il aurait été judicieux d'incorporer un groupe contrôle additionnel composé de souris *Amhr2^{CRE}*. Ce dernier aurait permis de discerner les potentiels effets de la toxicité de la recombinaise comparativement aux phénotypes dus à la recombinaison ciblée des gènes d'intérêts.

5.1.1.3 Mosaïcisme et efficacité de la recombinaison

Le mosaïcisme est décrit comme étant la présence dans un même individu de plusieurs types cellulaires ayant des génotypes différents. Dans le contexte du système Cre-lox, il s'expliquerait par des variations intra- et interindividuelles de l'expression de la recombinaise Cre. Dans un même organisme, la recombinaise Cre pourrait être efficace dans une certaine cellule, mais inefficace dans la cellule voisine. L'efficacité de la recombinaison peut varier en fonction du moment de l'expression de Cre, le nombre de cellules affectées ou la morphologie tissulaire. Plusieurs individus d'une même portée peuvent ainsi présenter des phénotypes similaires, mais à des degrés de sévérité variable pouvant limiter l'évaluation optimale. Des analyses moléculaires (Immunohistochimie, qPCR, hybridation in-situ) sont essentielles afin de valider l'efficacité de la recombinaison. Ces dernières peuvent aider à mettre en évidence un problème de mosaïcisme. Il est parfois difficile de confirmer cette recombinaison lorsque la population cellulaire ciblée est modeste. Ce problème de mosaïcisme a notamment été rencontré dans notre modèle Wnt, dont les phénotypes variaient d'une diminution des glandes endométriales jusqu'à une agénésie complète du tractus reproducteur femelle.

5.1.2 L'étude paradoxale du système reproducteur

L'évaluation morphologique et fonctionnelle d'un modèle murin nécessite une grande quantité d'animaux expérimentaux. La mise en place d'une colonie viable et fonctionnelle nécessite temps, énergie et investissement étalés sur plusieurs générations de souris. Dans la majorité des cas, l'obtention d'une colonie mature et homozygote pour les gènes d'intérêt floxés accélère grandement le processus d'évaluation du modèle. Cette réalité est souvent plus difficile dans le cas de l'évaluation du système reproducteur.

Lorsque la recombinaison est optimale et l'hypothèse de recherche véridique, le phénotype observé peut grandement perturber le développement et la fonction du tractus reproducteur. Cette éventualité limite l'utilisation d'homozygotes pour nos gènes d'intérêt et porteurs de la recombinaison Cre à des fins reproductrices. Pour pallier à cette situation, il est souvent nécessaire d'utiliser des reproducteurs porteurs de la Cre étant hétérozygotes pour nos gènes d'intérêt. Le nombre de souris expérimentales issues de ces croisements en est ainsi diminué.

Ce phénomène a grandement limité l'efficacité de notre étude de la voie Hippo en retardant l'obtention de précieux animaux homozygotes. Cela peut notamment être exemplifié par la quantité importante d'embryons qui a dû être disséqué puis génotypé afin d'obtenir un nombre raisonnable d'échantillons pour nos expériences. Ce problème était moins important dans le cas de la voie Wnt et il était possible d'utiliser des mâles homozygotes porteurs de la Cre pour nos couples reproducteurs. Notre colonie toutefois vieillissante présentait des difficultés et une baisse générale de la fertilité vers la fin du projet. Il était alors très difficile d'obtenir la quantité d'individus nécessaire pour améliorer les conclusions de notre article.

Nous avons aussi remarqué que l'incidence de la fuite de la Cre avec le système *Amhr2*^{CRE} était plus élevée lorsque cette dernière était héritée du côté maternel. Nous croyons que l'étroit contact entre les cellules de la granulosa (exprimant *Amhr2*) et l'ovocyte a pu occasionner une diffusion de la Cre vers l'oocyte. Une recombinaison y ayant lieu entraîne ainsi une augmentation de l'incidence d'allèles invalidées chez les fœtus, pouvant soit entraîner de la mortalité embryonnaire difficilement perceptible, soit avoir des conséquences délétères pour le maintien de la colonie. L'usage de mâles hétérozygotes porteurs de la Cre a pu limiter ce phénomène au détriment de la rapidité d'acquisition des animaux expérimentaux.

5.2 ÉLÉMENTS DE DISCUSSIONS ADDITIONNELS (PROJETS)

Les éléments de discussion respectifs à chaque projet ont été décrits en détail dans les manuscrits de recherche (voir résultats). L'objectif de cette section est d'établir quelques éléments de discussion additionnels.

5.2.1 *Wnt4* et *Wnt5a* effectuent des rôles redondants dans le développement de l'utérus

Les résultats obtenus consolident l'hypothèse de redondance fonctionnelle suspectée entre *Wnt4* et *Wnt5a* dans le contexte du développement et de la fonction du tractus reproducteur femelle. Ils ont aussi permis de ségréger partiellement leur rôle dans l'épithélium luminal et le stroma endométrial. Ces éléments pourraient s'avérer intéressants pour la compréhension de la pathophysiologie de certaines maladies utérines. Nos souris avec double invalidation conditionnelle pourraient constituer un modèle intéressant pour l'étude du syndrome MRKH. L'agénésie notée en absence de phénotype ovarien ou de masculinisation dans notre cas pourrait relancer le débat à l'effet de l'implication de *Wnt4* et possiblement *Wnt5a* dans l'étiologie du syndrome.

Quelques éléments ont toutefois limité une analyse plus exhaustive du modèle. Des pistes de solutions ont toutefois été envisagées afin de potentiellement améliorer la compréhension de ces rôles.

5.2.1.1 Facteurs limitants (projet *Wnt*)

L'âge avancé de la colonie, la recombinaison non-spécifique fréquemment rencontrée et les effets physiologiques notés sur le système reproducteur ont grandement diminué l'obtention d'animaux expérimentaux viables et vigoureux. La sélection d'animaux représentatifs (sans entraîner de biais sélectifs) représentait un défi de taille. Le mosaïcisme noté dans les phénotypes utérins rendait leur analyse fastidieuse.

Cette variabilité a grandement limité nos analyses mécanistiques. Seule l'analyse immunohistochimique a permis de confirmer l'efficacité de la recombinaison dans l'utérus. Les analyses qPCR testées sur les utérus de notre modèle ont démontré une grande disparité dans les résultats dû au mosaïcisme. De plus, nous n'avons pu trouver un gène de référence propice pour la normalisation des résultats. L'utilisation de la qPCR s'est donc révélée un échec en ce

qui a trait à l'analyse de la recombinaison, mais aussi toute analyse fonctionnelle subséquente (gènes cibles, mécanismes d'action, récepteurs impliqués, interactions avec d'autres voies, etc.).

Des essais infructueux ont aussi été effectués dans le but de caractériser les anomalies embryonnaires résultant en agénésie. La faible quantité d'individus affectés (30% des souris expérimentales) combinée à la faible vigueur reproductive de la colonie n'ont pas permis, dans un délai raisonnable, d'obtenir des embryons de qualité permettant l'évaluation du développement des canaux de Müller et des mécanismes impliqués.

5.2.1.3 Pistes de solution (projet *Wnt*)

Nos résultats suggèrent que l'expression de *Wnt4* et *Wnt5a* dans l'épithélium luminal est en partie impliquée dans la décidualisation et la formation des glandes. L'usage de modèles utilisant *PR^{cre}* et ciblant notamment le stroma, le myomètre et l'épithélium luminal ont permis d'établir l'implication individuelle de chacun des gènes (Cha et al., 2014; Franco et al., 2011). Il serait intéressant d'évaluer l'implication conjointe de *Wnt4* et *Wnt5a* dans un modèle utilisant *PR^{cre}*. Cela permettrait notamment de 1) établir un modèle dont la recombinaison serait potentiellement optimale 2) évaluer la possibilité de redondance fonctionnelle entre ces deux gènes dans un contexte utérin global 3) permettre une analyse comparative des interactions possibles entre l'épithélium et le stroma endométrial. En utilisant *WNT7a^{cre}*, il serait possible d'invalider nos gènes d'intérêt exclusivement dans l'épithélium luminal. Une évaluation comparative des différents modèles permettrait d'établir des corrélations entre les rôles observés selon la structure utérine invalidée.

Une évaluation embryologique exhaustive serait essentielle afin de bien comprendre leur implication dans le développement de l'utérus. L'usage d'un modèle *ex vivo* utilisant des explants permettrait, non sans difficulté, de palier aux problèmes reproducteurs notés dans notre colonie. Il serait possible de mettre en culture de canaux de Müller issus d'animaux contrôles (gènes d'intérêt floxés) (Yamamoto et al., 2018). Ces canaux pourraient être exposés à diverses méthodes d'invalidation, dont des siRNA ou la recombinaison Cre combinée à un adénovirus, et ce à divers stades de développement (W. C. Lee, Berry, Hohenstein, & Davies, 2008). L'utilisation de protéines recombinantes, d'agonistes ou d'antagonistes de la voie Wnt pourrait aussi être des alternatives. Une analyse complète serait par la suite possible. Il serait essentiel de s'assurer que la transfection et recombinaison aient lieu de façon efficace. Cette méthode

permettrait difficilement de cibler un segment ou une structure spécifique des canaux. Elle pourrait toutefois être réalisée suffisamment tôt pour évaluer le développement des canaux de Müller (Orvis & Behringer, 2007).

Il est suggéré, selon nos résultats, que WNT4 et WNT5a interagissent avec plus d'un récepteur (dont FZD1). Cette possibilité pourrait être évaluée à l'aide de diverses techniques d'analyse d'interactions protéine-protéine, dont la technique de co-immunoprécipitation.

5.2.2 *Lats1* et *Lats2* effectuent des rôles redondants dans le développement de l'utérus

Les résultats obtenus constituent la première évidence de l'implication de la voie Hippo dans le développement des canaux de Müller. Un phénotype similaire obtenu dans le développement des reins (McNeill & Reginensi, 2017) et des canaux de Wolff suggère d'autant plus un rôle général de la voie dans le développement du mésonéphron et de ses dérivés. Les résultats contribuent aussi à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation minutieuse des processus de différenciation du système reproducteur femelle et possiblement des maladies pouvant en découler.

Dans une perspective plus globale, l'implication de la voie Hippo dans la différenciation des cellules mésenchymateuses indifférenciées en myofibroblastes pourrait faire de cette voie une cible thérapeutique de choix dans la régulation du processus de fibrose rencontré dans une multitude de pathologies ou encore faciliter la guérison tissulaire dans certains contextes biologiques.

5.2.2.1 Facteurs limitants (Projet Hippo)

L'évaluation de la recombinaison s'est révélée un défi de taille. Les résultats obtenus par qPCR se sont révélés significatifs à E17.5 et P0. Toutefois, la diminution de la quantité relative d'ARNm de *Lats1* et *Lats2* ne dépassait guère les 50-60% malgré un phénotype convaincant. Nos analyses morphologiques ont montré que le phénotype est issu d'une région spécifique (antémésométrial) des canaux de Müller. L'échantillonnage pour qPCR est composé des canaux de Müller entiers. La portion inaffectée a vraisemblablement contribué à sous-évaluer la recombinaison de la population cellulaire ciblée. Des analyses immunohistochimiques (LATS1 et LATS2) ont été nécessaires afin de confirmer la perte des protéines dans la région ciblée.

Cette étape s'est révélée ardue de par le nombre limité d'anticorps disponible, leur efficacité et la quantité variable de signaux parasites (background).

Un phénotype ovarien a été observé. L'identité exacte des cellules composant le phénotype demeure incertaine. Il est à noter que le phénotype ovarien a été évalué de façon sommaire. Son analyse exhaustive se fera dans des projets collaboratifs.

Nos résultats suggèrent que l'action de la voie Hippo dans la régulation de l'identité cellulaire des canaux de Müller cible principalement les cellules multipotentes. Notre modèle *in vitro* ne suggère pas la présence de dédifférenciation telle qu'observée dans les cellules de la granulosa (Tsoi et al., 2019). Des essais ont été réalisés afin de mettre en culture des cellules du mésenchyme de Müller et induire la différenciation *in vitro*. La digestion et mise en culture des canaux de Müller a été possible, mais la pureté de l'échantillon obtenu demeure sous-optimale. Il a été possible d'invalider *Lats1* et *Lats2* à l'aide d'un adénovirus Cre. Cette invalidation n'a toutefois pas résulté en différenciation myofibroblastique. Il est possible que notre modèle n'ait pas résulté en augmentation significative des protéines YAP et TAZ, du moins en quantité suffisante pour induire la différenciation. Nous n'avons pu observer une augmentation conséquente de la quantité relative d'ARNm de *Ctgf*.

Le ChIP réalisé à P0 montre une augmentation significative de la liaison de TAZ sur le promoteur de *Ctgf*. La liaison de YAP, bien qu'augmentée, était similaire entre les groupes. Cela suggère que TAZ pourrait avoir une contribution accrue dans l'apparition du phénotype. La création d'un modèle avec quadruple invalidation (*Lats1*, *Lats2*, *Yap*, *Taz*) a été tentée puisqu'un sauvetage du phénotype s'est révélé une réussite dans certaines conditions (McNeill & Reginensi, 2017). Dans notre cas, l'obtention du modèle n'a pas résulté en sauvetage du phénotype. Il est possible que la recombinaison soit incomplète de par la quantité accrue de gènes à invalider. Encore, l'invalidation de *Yap* et *Taz* pourrait avoir eu lieu trop tardivement dans le processus, à un moment où la différenciation cellulaire serait déjà entamée. On ne peut exclure la possibilité que le phénotype soit la conséquence, en partie secondaire, de l'interaction d'autres voies de signalisation avec la voie Hippo.

5.2.2.2 Pistes de solution (Projet Hippo)

Dans notre modèle, il est suggéré que la différenciation en myofibroblaste est en partie associée à l'expression de *Ctgf*, un gène cible de la voie Hippo et TGF- β . Des évidences scientifiques suggèrent toutefois que ce gène ne peut à lui seul induire la différenciation en myofibroblaste. Ce procédé requiert l'implication de plusieurs gènes ou molécules clés. Les analyses effectuées dans le but d'évaluer les interactions avec la voie des SMADs ont été limitées et inconcluantes. Une analyse mécanistique plus approfondie de ces possibles interactions serait appropriée. Il serait aussi intéressant d'effectuer un modèle de triple invalidation *Lats1*, *Lats2* et *Ctgf*. Ce modèle permettrait d'étudier le rôle exact de *Ctgf* dans le développement du phénotype.

Un modèle *in vitro* dans lequel une surexpression de *Yap* et *Taz* serait tentée dans les cellules mésenchymales Müllériennes aurait peut-être davantage de succès que nos essais. Un modèle *in vitro* de mise en culture de canaux intacts permettrait aussi d'invalider les gènes à divers stades du développement des canaux.

L'implication du phénotype obtenu dans le contexte de la fibrose semble indéniable. Cette perspective ouvre le champ à de nombreuses avenues de recherche gynécologique. Il serait intéressant d'évaluer l'implication de la voie Hippo dans la pathophysiologie de la fibrose et des tumeurs utérines. Son implication pourrait être liée à la progression des cellules tumorales ou encore contribuer à la formation d'un stroma tumoral fibreux persistant. Des lignées immortalisées de cellules tumorales utérines existantes constitueraient un modèle initial intéressant pour l'obtention de données préliminaires.

5.3 Y A-T-IL DES INTERACTIONS NOTABLES ENTRE LES DEUX VOIES DANS LE DÉVELOPPEMENT DE L'UTÉRUS ?

Les évidences scientifiques les plus probantes indiquent que pYAP et pTAZ peuvent contribuer à la rétention cytoplasmique de la β -catenin et favoriser sa dégradation. L'activation de la voie Hippo pourrait donc contribuer à l'inactivation de la voie Wnt canonique. Dans notre modèle Hippo, l'invalidation de *Lats1* et *Lats2* diminuerait les niveaux de phosphorylation de YAP et TAZ et permettrait la stabilisation de la β -catenin. Nos résultats n'ont pas confirmé cette possibilité dans le développement des canaux de Müller. Nos résultats immunohistochimiques ont montré que les niveaux de YAP et TAZ (totaux) sont exprimés dans le mésenchyme de

Müller à E17.5 et P0. Toutefois, les niveaux de pYAP sont exprimés seulement à E17.5. Cela suggère que la voie Hippo est active durant l'embryogenèse, potentiellement afin de maintenir la multipotentialité du mésenchyme. La baisse notée suite à la naissance coordonne avec la différenciation post-natale de l'utérus. Cela indiquerait que les niveaux de pYAP et pTAZ seraient possiblement élevés au moment où *Wnt4* et *Wnt5a* contribuent aux étapes d'invagination/élongation des canaux sans toutefois limiter leur effet.

Trois hypothèses clés pourraient expliquer ces résultats.

- 1) Les voies Wnt et Hippo doivent être actives aux mêmes moments du développement des canaux de Müller, limitant les interactions synergiques possibles.

Il est possible que des interactions subtiles aient lieu, mais difficilement évaluables de par nos modèles. L'expression spatiotemporelle des deux voies est possiblement minutieusement coordonnée afin de réguler des processus différents dans le contexte du développement des canaux (prolifération et polarité planaire vs maintien de la multipotentialité). La fenêtre d'interactions pourrait être très étroite et la différenciation hâtive observée dans notre modèle Hippo aurait pu limiter l'observation de ces interactions. Il serait aussi possible que les patrons d'expression de ces voies soient coordonnés de façon à limiter les interactions potentiellement conflictuelles dans le développement des canaux. Dans notre cas, il est aussi possible que les niveaux d'expression de la voie Hippo dans notre modèle soient trop importants pour laisser place à des effets de la voie Wnt.

- 2) Les interactions potentielles entre les voies Wnt et Hippo dans le développement des canaux de Müller n'impliquent pas la β -catenin.

La littérature scientifique suggère que *Wnt4* et *Wnt5a* agissent préférentiellement via la voie Wnt non-canonique (voie calcique et polarité planaire). Il est possible que les effets de *Wnt4* et *Wnt5a* notés durant le développement des canaux s'exercent, en partie, via la voie non-canonique. À ce moment, soit aucune interaction notable n'est nécessaire entre les voies Wnt et Hippo, soit des interactions encore méconnues pourraient avoir lieu via des molécules intermédiaires de la voie Wnt non-canonique. Toutefois, nos résultats d'analyse du transcriptome ne semblent pas laisser d'indices présageant des interactions évidentes via ces voies. Additionnellement, les évidences d'interactions avec la β -catenin sont souvent associées

à la présence de TAZ. Nos résultats semblent indiquer des niveaux basaux relativement bas de TAZ comparativement à YAP dans le développement utérin.

- 3) Aucune interaction n'est nécessaire entre les voies Wnt et Hippo dans le développement des canaux de Müller.

Nos résultats indiquent que les voies régulent des processus différents durant le développement des canaux. Il est tout aussi possible que chaque voie s'implique de façon individuelle à sa tâche. Certaines observations phénotypiques notées pourraient s'avérer tout simplement anecdotique de par le potentiel tissulaire limité du mésenchyme de Müller (prolifération, différenciation et apoptose).

De nombreuses questions demeurent malheureusement sans réponses. Je suis toutefois convaincu que les résultats de ces recherches pourront servir de prémisse à de futurs projets permettant de répondre à ces dernières.

RÉFÉRENCES

1. Abedini, A., Zamberlam, G., Boerboom, D., & Price, C. A. (2015). Non-canonical WNT5A is a potential regulator of granulosa cell function in cattle. *Mol Cell Endocrinol*, *403*, 39-45. doi:10.1016/j.mce.2015.01.017
2. 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 J*, *30*(4), 1534-1547. doi:10.1096/fj.15-280313
3. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., & Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo j*, *16*(13), 3797-3804. doi:10.1093/emboj/16.13.3797
4. Abrahamsohn, P. A., & Zorn, T. M. (1993). Implantation and decidualization in rodents. *J Exp Zool*, *266*(6), 603-628. doi:10.1002/jez.1402660610
5. Anbanandam, A., Albarado, D. C., Nguyen, C. T., Halder, G., Gao, X., & Veeraraghavan, S. (2006). Insights into transcription enhancer factor 1 (TEF-1) activity from the solution structure of the TEA domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(46), 17225-17230. doi:10.1073/pnas.0607171103
6. Arango, N. A., Kobayashi, A., Wang, Y., Jamin, S. P., Lee, H. H., Orvis, G. D., & Behringer, R. R. (2008). A mesenchymal perspective of Mullerian duct differentiation and regression in *Amhr2-lacZ* mice. *Mol Reprod Dev*, *75*(7), 1154-1162. doi:10.1002/mrd.20858
7. Attisano, L., & Wrana, J. L. (2013). Signal integration in TGF- β , WNT, and Hippo pathways. *F1000Prime Reports*, *5*, 17. doi:10.12703/P5-17
8. 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

9. Azzolin, L., Zanconato, F., Bresolin, S., Forcato, M., Basso, G., Bicciato, S., . . . Piccolo, S. (2012). Role of TAZ as mediator of Wnt signaling. *Cell*, *151*(7), 1443-1456. doi:10.1016/j.cell.2012.11.027
10. Baarends, W. M., Uilenbroek, J. T., Kramer, P., Hoogerbrugge, J. W., van Leeuwen, E. C., Themmen, A. P., & Grootegoed, J. A. (1995). Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology*, *136*(11), 4951-4962. doi:10.1210/endo.136.11.7588229
11. Baarends, W. M., van Helmond, M. J., Post, M., van der Schoot, P. J., Hoogerbrugge, J. W., de Winter, J. P., . . . Meijers, J. H. (1994). A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct. *Development*, *120*(1), 189-197.
12. Baker, N. E. (1987). Molecular cloning of sequences from wingless, a segment polarity gene in *Drosophila*: the spatial distribution of a transcript in embryos. *EMBO J*, *6*(6), 1765-1773.
13. Balbin, M., Fueyo, A., Knauper, V., Pendas, A. M., Lopez, J. M., Jimenez, M. G., . . . Lopez-Otin, C. (1998). Collagenase 2 (MMP-8) expression in murine tissue-remodeling processes. Analysis of its potential role in postpartum involution of the uterus. *J Biol Chem*, *273*(37), 23959-23968. doi:10.1074/jbc.273.37.23959
14. Bao, X. M., He, Q., Wang, Y., Huang, Z. H., & Yuan, Z. Q. (2017). The roles and mechanisms of the Hippo/YAP signaling pathway in the nervous system. *Yi Chuan*, *39*(7), 630-641. doi:10.16288/j.ycz.17-069
15. Barros, C., Vigil, P., Herrera, E., Arguello, B., & Walker, R. (1984). Selection of morphologically abnormal sperm by human cervical mucus. *Arch Androl*, *12 Suppl*, 95-107.
16. Bashour, N. M., & Wray, S. (2012). Progesterone directly and rapidly inhibits GnRH neuronal activity via progesterone receptor membrane component 1. *Endocrinology*, *153*(9), 4457-4469. doi:10.1210/en.2012-1122

17. Benson, G. V., Lim, H., Paria, B. C., Satokata, I., Dey, S. K., & Maas, R. L. (1996). Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development*, 122(9), 2687-2696.
18. Bernard, P., & Harley, V. R. (2007). Wnt4 action in gonadal development and sex determination. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1), 31-43. doi:10.1016/j.biocel.2006.06.007
19. Bhatt, H., Brunet, L. J., & Stewart, C. L. (1991). Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(24), 11408-11412.
20. Biason-Lauber, A., De Filippo, G., Konrad, D., Scarano, G., Nazzaro, A., & Schoenle, E. J. (2007). WNT4 deficiency--a clinical phenotype distinct from the classic Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a case report. *Hum Reprod*, 22(1), 224-229. doi:10.1093/humrep/del360
21. Biason-Lauber, A., Konrad, D., Navratil, F., & Schoenle, E. J. (2004). A WNT4 mutation associated with Mullerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N Engl J Med*, 351(8), 792-798. doi:10.1056/NEJMoa040533
22. Bitler, B. G., Nicodemus, J. P., Li, H., Cai, Q., Wu, H., Hua, X., . . . Zhang, R. (2011). Wnt5a suppresses epithelial ovarian cancer by promoting cellular senescence. *Cancer Res*, 71(19), 6184-6194. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1341
23. Board, P. D. Q. A. T. E. (2002). Cervical Cancer Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version. In *PDQ Cancer Information Summaries*. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US).
24. Bodine, P. V. (2008). Wnt signaling control of bone cell apoptosis. *Cell Res*, 18(2), 248-253. doi:10.1038/cr.2008.13
25. Boggiano, J. C., Vanderzalm, P. J., & Fehon, R. G. (2011). Tao-1 phosphorylates Hippo/MST kinases to regulate the Hippo-Salvador-Warts tumor suppressor pathway. *Dev Cell*, 21(5), 888-895. doi:10.1016/j.devcel.2011.08.028
26. Bokhman, J. V. (1983). Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 15(1), 10-17. doi:10.1016/0090-8258(83)90111-7
27. Bouchard, M., Souabni, A., Mandler, M., Neubuser, A., & Busslinger, M. (2002). Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes Dev*, 16(22), 2958-2970. doi:10.1101/gad.240102

28. Boyer, A., Hermo, L., Paquet, M., Robaire, B., & Boerboom, D. (2008). Seminiferous tubule degeneration and infertility in mice with sustained activation of WNT/CTNNB1 signaling in sertoli cells. *Biol Reprod*, 79(3), 475-485. doi:10.1095/biolreprod.108.068627
29. Boyer, A., Lapointe, E., Zheng, X., Cowan, R. G., Li, H., Quirk, S. M., . . . Boerboom, D. (2010). WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility. *FASEB J*, 24(8), 3010-3025. doi:10.1096/fj.09-145789
30. Brody, J. R., & Cunha, G. R. (1989). Histologic, morphometric, and immunocytochemical analysis of myometrial development in rats and mice: I. Normal development. *Am J Anat*, 186(1), 1-20. doi:10.1002/aja.1001860102
31. Brueggmann, D., Jaque, J. M., Lee, A. W., Pearce, C. L., & Templeman, C. (2016). Expression of Wnt signaling pathway genes in human endometriosis tissue: a pilot study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 199, 214-215. doi:10.1016/j.ejogrb.2016.02.005
32. Brunner, E., Brunner, D., Fu, W., Hafen, E., & Basler, K. (1999). The dominant mutation Glazed is a gain-of-function allele of wingless that, similar to loss of APC, interferes with normal eye development. *Dev Biol*, 206(2), 178-188. doi:10.1006/dbio.1998.9136
33. Butler, M. T., & Wallingford, J. B. (2017). Planar cell polarity in development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(6), 375-388. doi:10.1038/nrm.2017.11
34. Byron, S. A., Gartside, M., Powell, M. A., Wellens, C. L., Gao, F., Mutch, D. G., . . . Pollock, P. M. (2012). FGFR2 point mutations in 466 endometrioid endometrial tumors: relationship with MSI, KRAS, PIK3CA, CTNNB1 mutations and clinicopathological features. *PLOS ONE*, 7(2), e30801. doi:10.1371/journal.pone.0030801
35. Byskov, A. G. (1974). Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. *J Reprod Fertil*, 37(2), 277-285.
36. Byun, M. R., Hwang, J. H., Kim, A. R., Kim, K. M., Hwang, E. S., Yaffe, M. B., & Hong, J. H. (2014). Canonical Wnt signalling activates TAZ through PP1A during

- osteogenic differentiation. *Cell Death and Differentiation*, 21(6), 854-863. doi:10.1038/cdd.2014.8
37. Callus, B. A., Verhagen, A. M., & Vaux, D. L. (2006). Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *Febs j*, 273(18), 4264-4276. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05427.x
38. Carroll, T. J., Park, J. S., Hayashi, S., Majumdar, A., & McMahon, A. P. (2005). Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Dev Cell*, 9(2), 283-292. doi:10.1016/j.devcel.2005.05.016
39. Carta, L., & Sassoon, D. (2004). Wnt7a is a suppressor of cell death in the female reproductive tract and is required for postnatal and estrogen-mediated growth. *Biol Reprod*, 71(2), 444-454. doi:10.1095/biolreprod.103.026534
40. Cha, J., Bartos, A., Park, C., Sun, X., Li, Y., Cha, S. W., . . . Dey, S. K. (2014). Appropriate crypt formation in the uterus for embryo homing and implantation requires Wnt5a-ROR signaling. *Cell Rep*, 8(2), 382-392. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.027
41. Chan, E. H., Nousiainen, M., Chalamalasetty, R. B., Schafer, A., Nigg, E. A., & Sillje, H. H. (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
42. Chan, H. C., Shi, Q. X., Zhou, C. X., Wang, X. F., Xu, W. M., Chen, W. Y., . . . Yuan, Y. Y. (2006). Critical role of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm. *Mol Cell Endocrinol*, 250(1-2), 106-113. doi:10.1016/j.mce.2005.12.032
43. Chan, H. C., & Sun, X. (2014). SLC26 anion exchangers in uterine epithelial cells and spermatozoa: clues from the past and hints to the future. *Cell Biol Int*, 38(1), 1-7. doi:10.1002/cbin.10183
44. Chan, Y. Y., Jayaprakasan, K., Zamora, J., Thornton, J. G., Raine-Fenning, N., & Coomarasamy, A. (2011). The prevalence of congenital uterine anomalies in unselected and high-risk populations: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 17(6), 761-771. doi:10.1093/humupd/dmr028

45. Chen, H., & Cheng, C. Y. (2016). Planar cell polarity (PCP) proteins and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, *59*, 99-109. doi:10.1016/j.semcdb.2016.04.010
46. Chen, H., Song, Y., Yang, S., Fu, J., Feng, X., & 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
47. Chen, H. I., & Sudol, M. (1995). The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(17), 7819-7823. doi:10.1073/pnas.92.17.7819
48. Chen, L., Chan, S. W., Zhang, X., Walsh, M., Lim, C. J., Hong, W., & Song, H. (2010). Structural basis of YAP recognition by TEAD4 in the hippo pathway. *Genes Dev*, *24*(3), 290-300. doi:10.1101/gad.1865310
49. Chen, Q., Zhang, Y., Lu, J., Wang, Q., Wang, S., Cao, Y., . . . Duan, E. (2009). Embryo-uterine cross-talk during implantation: the role of Wnt signaling. *Mol Hum Reprod*, *15*(4), 215-221. doi:10.1093/molehr/gap009
50. Chen, T. H., Chen, C. Y., Wen, H. C., Chang, C. C., Wang, H. D., Chuu, C. P., & Chang, C. H. (2017). YAP promotes myogenic differentiation via the MEK5-ERK5 pathway. *FASEB J*, *31*(7), 2963-2972. doi:10.1096/fj.201601090R
51. Cheng, C. W., Smith, S. K., & Charnock-Jones, D. S. (2008). Transcript profile and localization of Wnt signaling-related molecules in human endometrium. *Fertil Steril*, *90*(1), 201-204. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.05.077
52. Cheng, J., Rosario, G., Cohen, T. V., Hu, J., & Stewart, C. L. (2017). Tissue-Specific Ablation of the LIF Receptor in the Murine Uterine Epithelium Results in Implantation Failure. *Endocrinology*, *158*(6), 1916-1928. doi:10.1210/en.2017-00103
53. Cheroki, C., Krepischi-Santos, A. C., Rosenberg, C., Jehee, F. S., Mingroni-Netto, R. C., Pavanello Filho, I., . . . Otto, P. A. (2006). Report of a del22q11 in a patient with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) anomaly and exclusion of WNT-4, RAR-gamma, and RXR-alpha as major genes determining MRKH anomaly in a study of 25 affected women. *Am J Med Genet A*, *140*(12), 1339-1342. doi:10.1002/ajmg.a.31254
54. Clement-Ziza, M., Khen, N., Gonzales, J., Cretolle-Vastel, C., Picard, J. Y., Tullio-Pelet, A., . . . Nihoul-Fekete, C. (2005). Exclusion of WNT4 as a major gene in

- Rokitansky-Kuster-Hauser anomaly. *Am J Med Genet A*, 137(1), 98-99. doi:10.1002/ajmg.a.30833
55. Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127(3), 469-480. doi:10.1016/j.cell.2006.10.018
56. Condon, J. C., Jeyasuria, P., Faust, J. M., & Mendelson, C. R. (2004). Surfactant protein secreted by the maturing mouse fetal lung acts as a hormone that signals the initiation of parturition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(14), 4978. doi:10.1073/pnas.0401124101
57. Cooke, P. S., Ekman, G. C., Kaur, J., Davila, J., Bagchi, I. C., Clark, S. G., . . . Bartol, F. F. (2012). Brief exposure to progesterone during a critical neonatal window prevents uterine gland formation in mice. *Biol Reprod*, 86(3), 63. doi:10.1095/biolreprod.111.097188
58. Cooke, P. S., Spencer, T. E., Bartol, F. F., & Hayashi, K. (2013). Uterine glands: development, function and experimental model systems. *Mol Hum Reprod*, 19(9), 547-558. doi:10.1093/molehr/gat031
59. Coopes, A., Henry, C. E., Llamosas, E., & Ford, C. E. (2018). An update of Wnt signalling in endometrial cancer and its potential as a therapeutic target. *Endocr Relat Cancer*. doi:10.1530/erc-18-0112
60. Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicol Pathol*, 43(6), 776-793. doi:10.1177/0192623315570339
61. Cre-recombinase-associated toxicity highlights limitations of genome editing. (2013). *Disease Models & Mechanisms*, 6(6), 1299.
62. Davidson, L. M., & Coward, K. (2016). Molecular mechanisms of membrane interaction at implantation. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 108(1), 19-32. doi:10.1002/bdrc.21122
63. De Boer, J., Wang, H. J., & Van Blitterswijk, C. (2004). Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*, 10(3-4), 393-401. doi:10.1089/107632704323061753

64. De Clercq, K., Hennes, A., & Vriens, J. (2017). Isolation of Mouse Endometrial Epithelial and Stromal Cells for In Vitro Decidualization. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*(121), 55168. doi:10.3791/55168
65. de Mattos, R. M., Pereira, P. R., Barros, E. G., da Silva, J. H., Palmero, C. Y., da Costa, N. M., . . . Nasciutti, L. E. (2016). Aberrant levels of Wnt/beta-catenin pathway components in a rat model of endometriosis. *Histol Histopathol*, 31(8), 933-942. doi:10.14670/hh-11-730
66. de Ziegler, D., Bulletti, C., Fanchin, R., Epiney, M., & Brioschi, P. A. (2001). Contractility of the nonpregnant uterus: the follicular phase. *Ann N Y Acad Sci*, 943, 172-184.
67. Deans, R., & Abbott, J. (2010). Review of intrauterine adhesions. *J Minim Invasive Gynecol*, 17(5), 555-569. doi:10.1016/j.jmig.2010.04.016
68. Desmouliere, A., Redard, M., Darby, I., & Gabbiani, G. (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*, 146(1), 56-66.
69. Deutscher, E., & Hung-Chang Yao, H. (2007). Essential roles of mesenchyme-derived beta-catenin in mouse Mullerian duct morphogenesis. *Dev Biol*, 307(2), 227-236. doi:10.1016/j.ydbio.2007.04.036
70. Devine, P. J., Payne, C. M., McCuskey, M. K., & Hoyer, P. B. (2000). Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol Reprod*, 63(5), 1245-1252.
71. Di Benedetto, A., Mottolese, M., Sperati, F., Ercolani, C., Di Lauro, L., Pizzuti, L., . . . Maugeri-Saccà, M. (2016). The Hippo transducers TAZ/YAP and their target CTGF in male breast cancer. *Oncotarget*, 7(28), 43188-43198. doi:10.18632/oncotarget.9668
72. Dolci, S., Campolo, F., & De Felici, M. (2015). Gonadal development and germ cell tumors in mouse and humans. *Semin Cell Dev Biol*, 45, 114-123. doi:10.1016/j.semcdb.2015.10.002
73. Duan, P., & Bonewald, L. F. (2016). The role of the wnt/beta-catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth. *Int J Biochem Cell Biol*, 77(Pt A), 23-29. doi:10.1016/j.biocel.2016.05.015

74. Dunlap, K. A., Filant, J., Hayashi, K., Rucker, E. B., 3rd, Song, G., Deng, J. M., . . . Spencer, T. E. (2011). Postnatal deletion of *Wnt7a* inhibits uterine gland morphogenesis and compromises adult fertility in mice. *Biol Reprod*, *85*(2), 386-396. doi:10.1095/biolreprod.111.091769
75. Dyche, W. J. (1979). A comparative study of the differentiation and involution of the Mullerian duct and Wolffian duct in the male and female fetal mouse. *J Morphol*, *162*(2), 175-209. doi:10.1002/jmor.1051620203
76. Eggers, S., & Sinclair, A. (2012). Mammalian sex determination—insights from humans and mice. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, *20*(1), 215-238. doi:10.1007/s10577-012-9274-3
77. Elbjairami, W. M., Truong, L. D., Tawil, A., Wang, W., Dawson, S., Lan, H. Y., . . . Wayne Smith, C. (2010). Early differential expression of oncostatin M in obstructive nephropathy. *J Interferon Cytokine Res*, *30*(7), 513-523. doi:10.1089/jir.2009.0105
78. Endo, Y., Wolf, V., Muraiso, K., Kamijo, K., Soon, L., Uren, A., . . . Rubin, J. S. (2005). *Wnt-3a*-dependent cell motility involves RhoA activation and is specifically regulated by *dishevelled-2*. *J Biol Chem*, *280*(1), 777-786. doi:10.1074/jbc.M406391200
79. Erickson, R. P., Durbin, E. J., & Tres, L. L. (1987). Sex determination in mice: Y and chromosome 17 interactions. *Development*, *101 Suppl*, 25-32.
80. Eskander, R. N., Ali, S., Dellinger, T., Lankes, H. A., Randall, L. M., Ramirez, N. C., . . . Hoang, B. H. (2016). Expression Patterns of the Wnt Pathway Inhibitors Dickkopf3 and Secreted Frizzled-Related Proteins 1 and 4 in Endometrial Endometrioid Adenocarcinoma: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study. *Int J Gynecol Cancer*, *26*(1), 125-132. doi:10.1097/igc.0000000000000563
81. Eyden, B. (2008). The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med*, *12*(1), 22-37. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00213.x
82. Fan, X., Krieg, S., Hwang, J. Y., Dhal, S., Kuo, C. J., Lasley, B. L., . . . Nayak, N. R. (2012). Dynamic regulation of *Wnt7a* expression in the primate endometrium:

- implications for postmenstrual regeneration and secretory transformation. *Endocrinology*, 153(3), 1063-1069. doi:10.1210/en.2011-1826
83. Farah, O., Biechele, S., Rossant, J., & Dufort, D. (2017a). Porcupine-dependent Wnt activity within the uterine epithelium is essential for fertility. *Biol Reprod*, 97(5), 688-697. doi:10.1093/biolre/iox119
 84. Farah, O., Biechele, S., Rossant, J., & Dufort, D. (2017b). Porcupine-dependent Wnt signaling controls stromal proliferation and endometrial gland maintenance through the action of distinct WNTs. *Dev Biol*, 422(1), 58-69. doi:10.1016/j.ydbio.2016.11.023
 85. Farah, O., Biechele, S., Rossant, J., & Dufort, D. (2018). Regulation of porcupine-dependent Wnt signaling is essential for uterine development and function. *Reproduction*, 155(1), 93-102. doi:10.1530/rep-17-0436
 86. Ferrigno, O., Lallemand, F., Verrecchia, F., L'Hoste, S., Camonis, J., Atfi, A., & Mauviel, A. (2002). Yes-associated protein (YAP65) interacts with Smad7 and potentiates its inhibitory activity against TGF-beta/Smad signaling. *Oncogene*, 21(32), 4879-4884. doi:10.1038/sj.onc.1205623
 87. Filant, J., & Spencer, T. E. (2013). Endometrial glands are essential for blastocyst implantation and decidualization in the mouse uterus. *Biol Reprod*, 88(4), 93. doi:10.1095/biolreprod.113.107631
 88. Fontana, L., Gentilin, B., Fedele, L., Gervasini, C., & Miozzo, M. (2017). Genetics of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome. *Clin Genet*, 91(2), 233-246. doi:10.1111/cge.12883
 89. Franco, H. L., Dai, D., Lee, K. Y., Rubel, C. A., Roop, D., Boerboom, D., . . . DeMayo, F. J. (2011). WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse. *FASEB J*, 25(4), 1176-1187. doi:10.1096/fj.10-175349
 90. Fuchs, A. R., Fuchs, F., Husslein, P., & Soloff, M. S. (1984). Oxytocin receptors in the human uterus during pregnancy and parturition. *Am J Obstet Gynecol*, 150(6), 734-741.
 91. Fujii, M., Nakanishi, H., Toyoda, T., Tanaka, I., Kondo, Y., Osada, H., & Sekido, Y. (2012). Convergent signaling in the regulation of connective tissue growth factor in

- malignant mesothelioma: TGFbeta signaling and defects in the Hippo signaling cascade. *Cell Cycle*, 11(18), 3373-3379. doi:10.4161/cc.21397
92. Fujino, A., Arango, N. A., Zhan, Y., Manganaro, T. F., Li, X., MacLaughlin, D. T., & Donahoe, P. K. (2009). Cell migration and activated PI3K/AKT-directed elongation in the developing rat Mullerian duct. *Dev Biol*, 325(2), 351-362. doi:10.1016/j.ydbio.2008.10.027
 93. Fukuchi, T., Sakamoto, M., Tsuda, H., Maruyama, K., Nozawa, S., & Hirohashi, S. (1998). Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res*, 58(16), 3526-3528.
 94. Gaetje, R., Holtrich, U., Karn, T., Cikrit, E., Engels, K., Rody, A., & Kaufmann, M. (2007). Characterization of WNT7A expression in human endometrium and endometriotic lesions. *Fertil Steril*, 88(6), 1534-1540. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.01.128
 95. Galan, J. A., & Avruch, J. (2016). MST1/MST2 Protein Kinases: Regulation and Physiologic Roles. *Biochemistry*, 55(39), 5507-5519. doi:10.1021/acs.biochem.6b00763
 96. Gao, L., Rabbitt, E. H., Condon, J. C., Renthal, N. E., Johnston, J. M., Mitsche, M. A., . . . Mendelson, C. R. (2015). Steroid receptor coactivators 1 and 2 mediate fetal-to-maternal signaling that initiates parturition. *J Clin Invest*, 125(7), 2808-2824. doi:10.1172/jci78544
 97. Gao, Y., Bayless, K. J., & Li, Q. (2014). TGFBR1 is required for mouse myometrial development. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 28(3), 380-394. doi:10.1210/me.2013-1284
 98. Garrett, Q., Khaw, P. T., Blalock, T. D., Schultz, G. S., Grotendorst, G. R., & Daniels, J. T. (2004). Involvement of CTGF in TGF-beta1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(4), 1109-1116.
 99. Gendron, R. L., Paradis, H., Hsieh-Li, H. M., Lee, D. W., Potter, S. S., & Markoff, E. (1997). Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in Hoxa-11 null mice. *Biol Reprod*, 56(5), 1097-1105. doi:10.1095/biolreprod56.5.1097

100. Gerarduzzi, C., & Di Battista, J. A. (2017). Myofibroblast repair mechanisms post-inflammatory response: a fibrotic perspective. *Inflamm Res*, 66(6), 451-465. doi:10.1007/s00011-016-1019-x
101. Gieske, M. C., Kim, H. J., Legan, S. J., Koo, Y., Krust, A., Chambon, P., & Ko, C. (2008). Pituitary Gonadotroph Estrogen Receptor- α Is Necessary for Fertility in Females. *Endocrinology*, 149(1), 20-27. doi:10.1210/en.2007-1084
102. Gomez, I. G., Roach, A. M., Nakagawa, N., Amatucci, A., Johnson, B. G., Dunn, K., . . . Duffield, J. S. (2016). TWEAK-Fn14 Signaling Activates Myofibroblasts to Drive Progression of Fibrotic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*, 27(12), 3639-3652. doi:10.1681/asn.2015111227
103. Goodman, H. M. (2009). Chapter 12 - Hormonal Control of Reproduction in the Male. In H. M. Goodman (Ed.), *Basic Medical Endocrinology (Fourth Edition)* (pp. 239-256). San Diego: Academic Press.
104. Goulev, Y., Fauny, J. D., Gonzalez-Marti, B., Flagiello, D., Silber, J., & Zider, A. (2008). SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*. *Curr Biol*, 18(6), 435-441. doi:10.1016/j.cub.2008.02.034
105. Graham, J. D., & Clarke, C. L. (1997). Physiological Action of Progesterone in Target Tissues*. *Endocrine Reviews*, 18(4), 502-519. doi:10.1210/edrv.18.4.0308
106. Grannas, K., Arngarden, L., Lonn, P., Mazurkiewicz, M., Blokzijl, A., Zieba, A., & Soderberg, O. (2015). Crosstalk between Hippo and TGFbeta: Subcellular Localization of YAP/TAZ/Smad Complexes. *J Mol Biol*, 427(21), 3407-3415. doi:10.1016/j.jmb.2015.04.015
107. Gravina, F. S., van Helden, D. F., Kerr, K. P., de Oliveira, R. B., & Jobling, P. (2014). Phasic contractions of the mouse vagina and cervix at different phases of the estrus cycle and during late pregnancy. *PLOS ONE*, 9(10), e111307-e111307. doi:10.1371/journal.pone.0111307
108. Green, J. L., La, J., Yum, K. W., Desai, P., Rodewald, L. W., Zhang, X., . . . Wahl, G. M. (2013). Paracrine Wnt signaling both promotes and inhibits human breast tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(17), 6991-6996. doi:10.1073/pnas.1303671110

109. Greene, A. D., Lang, S. A., Kendzierski, J. A., Sroga-Rios, J. M., Herzog, T. J., & Burns, K. A. (2016). Endometriosis: where are we and where are we going? *Reproduction*, *152*(3), R63-78. doi:10.1530/rep-16-0052
110. Grotendorst, G. R., Rahmanie, H., & Duncan, M. R. (2004). Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J*, *18*(3), 469-479. doi:10.1096/fj.03-0699com
111. Han, G., Li, A. G., Liang, Y. Y., Owens, P., He, W., Lu, S., . . . Wang, X. J. (2006). Smad7-induced beta-catenin degradation alters epidermal appendage development. *Dev Cell*, *11*(3), 301-312. doi:10.1016/j.devcel.2006.06.014
112. Hannema, S. E., & Hughes, I. A. (2007). Regulation of Wolffian Duct Development. *Hormone Research in Paediatrics*, *67*(3), 142-151. doi:10.1159/000096644
113. Hao, Y., Chun, A., Cheung, K., Rashidi, B., & Yang, X. (2008). Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. *J Biol Chem*, *283*(9), 5496-5509. doi:10.1074/jbc.M709037200
114. Harkness, M. L., & Harkness, R. D. (1954). The collagen content of the reproductive tract of the rat during pregnancy and lactation. *J Physiol*, *123*(3), 492-500. doi:10.1113/jphysiol.1954.sp005066
115. Harvey, K. F., Pflieger, C. M., & Hariharan, I. K. (2003). The Drosophila Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell*, *114*(4), 457-467.
116. Harwood, B. N., Cross, S. K., Radford, E. E., Haac, B. E., & De Vries, W. N. (2008). Members of the WNT signaling pathways are widely expressed in mouse ovaries, oocytes, and cleavage stage embryos. *Dev Dyn*, *237*(4), 1099-1111. doi:10.1002/dvdy.21491
117. Hatano, O., Takakusu, A., Nomura, M., & Morohashi, K. (1996). Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Genes Cells*, *1*(7), 663-671.
118. Hayashi, K., Burghardt, R. C., Bazer, F. W., & Spencer, T. E. (2007). WNTs in the ovine uterus: potential regulation of periimplantation ovine conceptus development. *Endocrinology*, *148*(7), 3496-3506. doi:10.1210/en.2007-0283

119. Hayashi, K., Erikson, D. W., Tilford, S. A., Bany, B. M., Maclean, J. A., 2nd, Rucker, E. B., 3rd, . . . Spencer, T. E. (2009). Wnt genes in the mouse uterus: potential regulation of implantation. *Biol Reprod*, *80*(5), 989-1000. doi:10.1095/biolreprod.108.075416
120. 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. *Biol Reprod*, *84*(2), 308-319. doi:10.1095/biolreprod.110.088161
121. He, B., Ni, Z. L., Kong, S. B., Lu, J. H., & Wang, H. B. (2018). Homeobox genes for embryo implantation: From mouse to human. *Animal Model Exp Med*, *1*(1), 14-22. doi:10.1002/ame2.12002
122. He, C., Lv, X., Huang, C., Angeletti, P. C., Hua, G., Dong, J., . . . Wang, C. (2019). A Human Papillomavirus-Independent Cervical Cancer Animal Model Reveals Unconventional Mechanisms of Cervical Carcinogenesis. *Cell Rep*, *26*(10), 2636-2650.e2635. doi:10.1016/j.celrep.2019.02.004
123. He, C., Mao, D., Hua, G., Lv, X., Chen, X., Angeletti, P. C., . . . Wang, C. (2015). The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression. *EMBO molecular medicine*, *7*(11), 1426-1449. doi:10.15252/emmm.201404976
124. Heallen, T., Zhang, M., Wang, J., Bonilla-Claudio, M., Klysik, E., Johnson, R. L., & Martin, J. F. (2011). Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science*, *332*(6028), 458-461. doi:10.1126/science.1199010
125. Heinosalo, T., Gabriel, M., Kallio, L., Adhikari, P., Huhtinen, K., Laajala, T. D., . . . Poutanen, M. (2018). Secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) expression promotes lesion proliferation via canonical WNT signaling and indicates lesion borders in extraovarian endometriosis. *Hum Reprod*, *33*(5), 817-831. doi:10.1093/humrep/dey026
126. Henry, C. E., Llamosas, E., Daniels, B., Coopes, A., Tang, K., & Ford, C. E. (2018). ROR1 and ROR2 play distinct and opposing roles in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, *148*(3), 576-584. doi:10.1016/j.ygyno.2018.01.025

127. Hergovich, A., Schmitz, D., & Hemmings, B. A. (2006). The human tumour suppressor LATS1 is activated by human MOB1 at the membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 345(1), 50-58. doi:10.1016/j.bbrc.2006.03.244
128. Herington, J. L., O'Brien, C., Robuck, M. F., Lei, W., Brown, N., Slaughter, J. C., . . . Reese, J. (2018). Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 1 Mediates the Timing of Parturition in Mice Despite Unhindered Uterine Contractility. *Endocrinology*, 159(1), 490-505. doi:10.1210/en.2017-00647
129. Hernandez Gifford, J. A. (2015). The role of WNT signaling in adult ovarian folliculogenesis. *Reproduction*, 150(4), R137-148. doi:10.1530/REP-14-0685
130. Hernandez Gifford, J. A., Hunzicker-Dunn, M. E., & Nilson, J. H. (2009). Conditional deletion of beta-catenin mediated by Amhr2cre in mice causes female infertility. *Biol Reprod*, 80(6), 1282-1292. doi:10.1095/biolreprod.108.072280
131. Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M. L., & Gabbiani, G. (2007). The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*, 170(6), 1807-1816. doi:10.2353/ajpath.2007.070112
132. Hoa, L., Kulaberoglu, Y., Gundogdu, R., Cook, D., Mavis, M., Gomez, M., . . . Hergovich, A. (2016). The characterisation of LATS2 kinase regulation in Hippo-YAP signalling. *Cell Signal*, 28(5), 488-497. doi:10.1016/j.cellsig.2016.02.012
133. Hoar, R. M. (1976). Comparative developmental aspects of selected organ systems. II. Gastrointestinal and urogenital systems. *Environmental health perspectives*, 18, 61-66. doi:10.1289/ehp.761861
134. Hoppler, S., & Moon, R. T. (2014). *Wnt signaling in development and disease : molecular mechanisms and biological functions*: Hoboken, New Jersey : Wiley Blackwell.
135. Hori, T., Takaori-Kondo, A., Kamikubo, Y., & Uchiyama, T. (2000). Molecular cloning of a novel human protein kinase, kpm, that is homologous to warts/lats, a *Drosophila* tumor suppressor. *Oncogene*, 19(27), 3101-3109. doi:10.1038/sj.onc.1203659
136. Hou, X., Tan, Y., Li, M., Dey, S. K., & Das, S. K. (2004). Canonical Wnt signaling is critical to estrogen-mediated uterine growth. *Mol Endocrinol*, 18(12), 3035-3049. doi:10.1210/me.2004-0259

137. Hsu, K. F., Pan, H. A., Hsu, Y. Y., Wu, C. M., Chung, W. J., & Huang, S. C. (2014). Enhanced myometrial autophagy in postpartum uterine involution. *Taiwan J Obstet Gynecol*, *53*(3), 293-302. doi:10.1016/j.tjog.2013.01.030
138. Hu, Y. C., Okumura, L. M., & Page, D. C. (2013). Gata4 is required for formation of the genital ridge in mice. *PLoS Genet*, *9*(7), e1003629. doi:10.1371/journal.pgen.1003629
139. Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., & 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
140. Hwang, J. H., Kim, A. R., Kim, K. M., Il Park, J., Oh, H. T., Moon, S. A., . . . Hong, J. H. (2019). TAZ couples Hippo/Wnt signalling and insulin sensitivity through Irs1 expression. *Nat Commun*, *10*(1), 421. doi:10.1038/s41467-019-08287-x
141. Ikeda, Y., Shen, W. H., Ingraham, H. A., & Parker, K. L. (1994). Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Molecular Endocrinology*, *8*(5), 654-662. doi:10.1210/mend.8.5.8058073
142. Imajo, M., Miyatake, K., Iimura, A., Miyamoto, A., & Nishida, E. (2012). A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/ β -catenin signalling. *The EMBO Journal*, *31*(5), 1109-1122. doi:10.1038/emboj.2011.487
143. Imamura, T., Luedke, C. E., Vogt, S. K., & Muglia, L. J. (2000). Oxytocin modulates the onset of murine parturition by competing ovarian and uterine effects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *279*(3), R1061-1067. doi:10.1152/ajpregu.2000.279.3.R1061
144. Jaffer, S., Shynlova, O., & Lye, S. (2009). Mammalian target of rapamycin is activated in association with myometrial proliferation during pregnancy. *Endocrinology*, *150*(10), 4672-4680. doi:10.1210/en.2009-0419
145. Jamin, S. P., Arango, N. A., Mishina, Y., Hanks, M. C., & Behringer, R. R. (2002). Requirement of *Bmpr1a* for Müllerian duct regression during male sexual development. *Nat Genet*, *32*(3), 408-410. doi:10.1038/ng1003

146. Jeong, J.-W., Kwak, I., Lee, K. Y., Kim, T. H., Large, M. J., Stewart, C. L., . . . DeMayo, F. J. (2010). Foxa2 Is Essential for Mouse Endometrial Gland Development and Fertility. *Biology of Reproduction*, 83(3), 396-403. doi:10.1095/biolreprod.109.083154
147. Jeyasuria, P., Ikeda, Y., Jamin, S. P., Zhao, L., De Rooij, D. G., Themmen, A. P., . . . Parker, K. L. (2004). Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Mol Endocrinol*, 18(7), 1610-1619. doi:10.1210/me.2003-0404
148. Jeyasuria, P., Subedi, K., Suresh, A., & Condon, J. C. (2011). Elevated levels of uterine anti-apoptotic signaling may activate NFkB and potentially confer resistance to caspase 3-mediated apoptotic cell death during pregnancy in mice. *Biol Reprod*, 85(2), 417-424. doi:10.1095/biolreprod.111.091652
149. Ji, L., Brkic, J., Liu, M., Fu, G., Peng, C., & Wang, Y. L. (2013). Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Mol Aspects Med*, 34(5), 981-1023. doi:10.1016/j.mam.2012.12.008
150. Jin, S.-K., & Yang, W.-X. (2016). Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget*, 8(2), 3600-3627. doi:10.18632/oncotarget.12274
151. Jorgez, C. J., Klysik, M., Jamin, S. P., Behringer, R. R., & Matzuk, M. M. (2004). Granulosa cell-specific inactivation of follistatin causes female fertility defects. *Mol Endocrinol*, 18(4), 953-967. doi:10.1210/me.2003-0301
152. Justice, R. W., Zilian, O., Woods, D. F., Noll, M., & 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 Dev*, 9(5), 534-546.
153. Kahlert, U. D., Maciaczyk, D., Doostkam, S., Orr, B. A., Simons, B., Bogiel, T., . . . Maciaczyk, J. (2012). Activation of canonical WNT/beta-catenin signaling enhances in vitro motility of glioblastoma cells by activation of ZEB1 and other activators of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Lett*, 325(1), 42-53. doi:10.1016/j.canlet.2012.05.024
154. Kanai, F., Marignani, P. A., Sarbassova, D., Yagi, R., Hall, R. A., Donowitz, M., . . . Yaffe, M. B. (2000). TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions

- with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *Embo j*, 19(24), 6778-6791. doi:10.1093/emboj/19.24.6778
155. Karner, C., Wharton, K. A., & Carroll, T. J. (2006). Apical-basal polarity, Wnt signaling and vertebrate organogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 17(2), 214-222. doi:10.1016/j.semcdb.2006.05.007
156. Kawano, Y., & Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of Cell Science*, 116(13), 2627. doi:10.1242/jcs.00623
157. Kessler, C. A., Bachurski, C. J., Schroeder, J., Stanek, J., & Handwerger, S. (2008). TEAD1 inhibits prolactin gene expression in cultured human uterine decidual cells. *Mol Cell Endocrinol*, 295(1-2), 32-38. doi:10.1016/j.mce.2008.08.007
158. Khokhlatchev, A., Rabizadeh, S., Xavier, R., Nedwidek, M., Chen, T., Zhang, X. F., . . . Avruch, J. (2002). Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway. *Curr Biol*, 12(4), 253-265. doi:10.1016/s0960-9822(02)00683-8
159. Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., & Matsumoto, S. (2011). New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int Rev Cell Mol Biol*, 291, 21-71. doi:10.1016/B978-0-12-386035-4.00002-1
160. Kim, M., Kim, M., Park, S. J., Lee, C., & Lim, D. S. (2016). Role of Angiomotin-like 2 mono-ubiquitination on YAP inhibition. *EMBO Rep*, 17(1), 64-78. doi:10.15252/embr.201540809
161. Kim, M. K., Jang, J. W., & Bae, S. C. (2018). DNA binding partners of YAP/TAZ. *BMB Rep*, 51(3), 126-133. doi:10.5483/bmbrep.2018.51.3.015
162. Klattig, J., Sierig, R., Kruspe, D., Besenbeck, B., & Englert, C. (2007). Wilms' Tumor Protein Wt1 Is an Activator of the Anti-Müllerian Hormone Receptor Gene Amhr2. *Molecular and Cellular Biology*, 27(12), 4355-4364. doi:10.1128/MCB.01780-06
163. Klingberg, F., Hinz, B., & White, E. S. (2013). The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *The Journal of pathology*, 229(2), 298-309. doi:10.1002/path.4104
164. Klinge, C. M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic acids research*, 29(14), 2905-2919. doi:10.1093/nar/29.14.2905

165. Kobayashi, A., Shawlot, W., Kania, A., & Behringer, R. R. (2004). Requirement of *Lim1* for female reproductive tract development. *Development*, *131*(3), 539-549. doi:10.1242/dev.00951
166. Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, *4*(2), 68-75.
167. Konsavage, W. M., Jr., Kyler, S. L., Rennoll, S. A., Jin, G., & Yochum, G. S. (2012). Wnt/beta-catenin signaling regulates Yes-associated protein (YAP) gene expression in colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem*, *287*(15), 11730-11739. doi:10.1074/jbc.M111.327767
168. Kunz, G., Beil, D., Deininger, H., Wildt, L., & Leyendecker, G. (1996). The dynamics of rapid sperm transport through the female genital tract: evidence from vaginal sonography of uterine peristalsis and hysterosalpingoscintigraphy. *Hum Reprod*, *11*(3), 627-632.
169. Kurita, T., Lee, K.-j., Cooke, P. S., Taylor, J. A., Lubahn, D. B., & Cunha, G. R. (2000). Paracrine Regulation of Epithelial Progesterone Receptor by Estradiol in the Mouse Female Reproductive Tract1. *Biology of Reproduction*, *62*(4), 821-830. doi:10.1093/biolreprod/62.4.821
170. Kurita, T., Lee, K., Saunders, P. T., Cooke, P. S., Taylor, J. A., Lubahn, D. B., . . . Cunha, G. R. (2001). Regulation of progesterone receptors and decidualization in uterine stroma of the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Biol Reprod*, *64*(1), 272-283. doi:10.1095/biolreprod64.1.272
171. Kutteh, W. H., Prince, S. J., Hammond, K. R., Kutteh, C. C., & Mestecky, J. (1996). Variations in immunoglobulins and IgA subclasses of human uterine cervical secretions around the time of ovulation. *Clin Exp Immunol*, *104*(3), 538-542.
172. Kyathanahalli, C., Marks, J., Nye, K., Lao, B., Albrecht, E. D., Aberdeen, G. W., . . . Condon, J. C. (2013). Cross-species withdrawal of MCL1 facilitates postpartum uterine involution in both the mouse and baboon. *Endocrinology*, *154*(12), 4873-4884. doi:10.1210/en.2013-1325
173. Lai, D., Ho, K. C., Hao, Y., & Yang, X. (2011). Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional

- targets Cyr61 and CTGF. *Cancer Res*, 71(7), 2728-2738. doi:10.1158/0008-5472.Can-10-2711
174. 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
175. Lam, A. P., & Gottardi, C. J. (2011). beta-catenin signaling: a novel mediator of fibrosis and potential therapeutic target. *Curr Opin Rheumatol*, 23(6), 562-567. doi:10.1097/BOR.0b013e32834b3309
176. 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. *Biol Reprod*, 87(5), 104. doi:10.1095/biolreprod.112.102608
177. Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A., Zeinstra, L. M., Davis, A. M., Wright, C. V., . . . Hogan, B. L. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev*, 13(4), 424-436. doi:10.1101/gad.13.4.424
178. Ledig, S., & Wieacker, P. (2018). Clinical and genetic aspects of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Med Genet*, 30(1), 3-11. doi:10.1007/s11825-018-0173-7
179. Lee, D. H., Park, J. O., Kim, T. S., Kim, S. K., Kim, T. H., Kim, M. C., . . . Lim, D. S. (2016). LATS-YAP/TAZ controls lineage specification by regulating TGFbeta signaling and Hnf4alpha expression during liver development. *Nat Commun*, 7, 11961. doi:10.1038/ncomms11961
180. Lee, H. J., Park, Y. M., Jee, B. C., Kim, Y. B., & Suh, C. S. (2015). Various anatomic locations of surgically proven endometriosis: A single-center experience. *Obstetrics & gynecology science*, 58(1), 53-58. doi:10.5468/ogs.2015.58.1.53
181. Lee, H. J., & Zheng, J. J. (2010). PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun Signal*, 8, 8. doi:10.1186/1478-811x-8-8
182. Lee, W. C., Berry, R., Hohenstein, P., & Davies, J. (2008). siRNA as a tool for investigating organogenesis: The pitfalls and the promises. *Organogenesis*, 4(3), 176-181.
183. 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. *Mol Cell Biol*, 28(7), 2426-2436. doi:10.1128/mcb.01874-07

184. Lenga, Y., Koh, A., Perera, A. S., McCulloch, C. A., Sodek, J., & Zohar, R. (2008). Osteopontin expression is required for myofibroblast differentiation. *Circ Res*, *102*(3), 319-327. doi:10.1161/circresaha.107.160408
185. Leppert, P. C., Jayes, F. L., & Segars, J. H. (2014). The extracellular matrix contributes to mechanotransduction in uterine fibroids. *Obstetrics and gynecology international*, *2014*, 783289-783289. doi:10.1155/2014/783289
186. Li, P., Chen, Y., Mak, K. K., Wong, C. K., Wang, C. C., & Yuan, P. (2013). Functional role of Mst1/Mst2 in embryonic stem cell differentiation. *PLOS ONE*, *8*(11), e79867. doi:10.1371/journal.pone.0079867
187. Li, Q., Kannan, A., Das, A., Demayo, F. J., Hornsby, P. J., Young, S. L., . . . Bagchi, I. C. (2013). WNT4 acts downstream of BMP2 and functions via beta-catenin signaling pathway to regulate human endometrial stromal cell differentiation. *Endocrinology*, *154*(1), 446-457. doi:10.1210/en.2012-1585
188. Liang, Y.-X., Liu, L., Jin, Z.-Y., Liang, X.-H., Fu, Y.-S., Gu, X.-W., & Yang, Z.-M. (2018). The high concentration of progesterone is harmful for endometrial receptivity and decidualization. *Scientific Reports*, *8*(1), 712. doi:10.1038/s41598-017-18643-w
189. Lin, K. C., Park, H. W., & Guan, K. L. (2017). Regulation of the Hippo Pathway Transcription Factor TEAD. *Trends Biochem Sci*, *42*(11), 862-872. doi:10.1016/j.tibs.2017.09.003
190. Lin, S. C., Lee, H. C., Hou, P. C., Fu, J. L., Wu, M. H., & Tsai, S. J. (2017). Targeting hypoxia-mediated YAP1 nuclear translocation ameliorates pathogenesis of endometriosis without compromising maternal fertility. *J Pathol*, *242*(4), 476-487. doi:10.1002/path.4922
191. Lipson, K. E., Wong, C., Teng, Y., & Spong, S. (2012). CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, *5*(Suppl 1), S24. doi:10.1186/1755-1536-5-s1-s24
192. Liu, C. Y., Zha, Z. Y., Zhou, X., Zhang, H., Huang, W., Zhao, D., . . . Guan, K. L. (2010). The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF β -TrCP E3 ligase. *J Biol Chem*, *285*(48), 37159-37169. doi:10.1074/jbc.M110.152942

193. Liu, F., Lagares, D., Choi, K. M., Stopfer, L., Marinkovic, A., Vrbanac, V., . . . Tschumperlin, D. J. (2015). Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 308(4), L344-357. doi:10.1152/ajplung.00300.2014
194. Liu, T., Liu, Y., Gao, H., Meng, F., Yang, S., & Lou, G. (2013). Clinical significance of yes-associated protein overexpression in cervical carcinoma: the differential effects based on histotypes. *Int J Gynecol Cancer*, 23(4), 735-742. doi:10.1097/IGC.0b013e31828c8619
195. Liu, W., Rui, H., Wang, J., Lin, S., He, Y., Chen, M., . . . Lin, S. C. (2006). Axin is a scaffold protein in TGF-beta signaling that promotes degradation of Smad7 by Arkadia. *Embo j*, 25(8), 1646-1658. doi:10.1038/sj.emboj.7601057
196. Liu, Y., Liu, H., Meyer, C., Li, J., Nadalin, S., Konigsrainer, A., . . . ten Dijke, P. (2013). Transforming growth factor-beta (TGF-beta)-mediated connective tissue growth factor (CTGF) expression in hepatic stellate cells requires Stat3 signaling activation. *J Biol Chem*, 288(42), 30708-30719. doi:10.1074/jbc.M113.478685
197. Liu, Y., Meng, F., Xu, Y., Yang, S., Xiao, M., Chen, X., & Lou, G. (2013). Overexpression of Wnt7a is associated with tumor progression and unfavorable prognosis in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 23(2), 304-311. doi:10.1097/IGC.0b013e31827c7708
198. Liu, Y., Patel, L., Mills, G. B., Lu, K. H., Sood, A. K., Ding, L., . . . Zhang, W. (2014). Clinical significance of CTNNB1 mutation and Wnt pathway activation in endometrioid endometrial carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 106(9). doi:10.1093/jnci/dju245
199. Liu, Y., Wang, D. K., & Chen, L. M. (2012). The physiology of bicarbonate transporters in mammalian reproduction. *Biol Reprod*, 86(4), 99. doi:10.1095/biolreprod.111.096826
200. Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H. B., Allak, B. A., van Drunen, E., Kanaar, R., . . . Jonkers, J. (2001). Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(16), 9209-9214. doi:10.1073/pnas.161269798

201. Lv, X. B., Liu, C. Y., Wang, Z., Sun, Y. P., Xiong, Y., Lei, Q. Y., & Guan, K. L. (2015). PARD3 induces TAZ activation and cell growth by promoting LATS1 and PP1 interaction. *EMBO Rep*, *16*(8), 975-985. doi:10.15252/embr.201439951
202. 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 Dev*, *9*(18), 2266-2278. doi:10.1101/gad.9.18.2266
203. Lyons, E. A., Taylor, P. J., Zheng, X. H., Ballard, G., Levi, C. S., & Kredentser, J. V. (1991). Characterization of subendometrial myometrial contractions throughout the menstrual cycle in normal fertile women. *Fertil Steril*, *55*(4), 771-774.
204. Ma, W. G., Song, H., Das, S. K., Paria, B. C., & Dey, S. K. (2003). Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(5), 2963-2968. doi:10.1073/pnas.0530162100
205. Macias, M. J., Hyvonen, M., Baraldi, E., Schultz, J., Sudol, M., Saraste, M., & Oschkinat, H. (1996). Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature*, *382*(6592), 646-649. doi:10.1038/382646a0
206. Mahoney, J. E., Mori, M., Szymaniak, A. D., Varelas, X., & Cardoso, W. V. (2014). The hippo pathway effector Yap controls patterning and differentiation of airway epithelial progenitors. *Dev Cell*, *30*(2), 137-150. doi:10.1016/j.devcel.2014.06.003
207. Makita, R., Uchijima, Y., Nishiyama, K., Amano, T., Chen, Q., Takeuchi, T., . . . Kurihara, H. (2008). Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *Am J Physiol Renal Physiol*, *294*(3), F542-553. doi:10.1152/ajprenal.00201.2007
208. Malekar, P., Hagenmueller, M., Anyanwu, A., Buss, S., Streit, M. R., Weiss, C. S., . . . Hardt, S. E. (2010). Wnt signaling is critical for maladaptive cardiac hypertrophy and accelerates myocardial remodeling. *Hypertension*, *55*(4), 939-945. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.141127
209. Mallo, M., & Alonso, C. R. (2013). The regulation of Hox gene expression during animal development. *Development*, *140*(19), 3951. doi:10.1242/dev.068346

210. Manase, K., Endo, T., Chida, M., Nagasawa, K., Honnma, H., Yamazaki, K., . . . Saito, T. (2006). Coordinated elevation of membrane type 1-matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 expression in rat uterus during postpartum involution. *Reprod Biol Endocrinol*, 4, 32. doi:10.1186/1477-7827-4-32
211. Martin-DeLeon, P. A. (2016). Uterosomes: Exosomal cargo during the estrus cycle and interaction with sperm. *Front Biosci (Schol Ed)*, 8, 115-122.
212. Masckauchan, T. N., Shawber, C. J., Funahashi, Y., Li, C. M., & Kitajewski, J. (2005). Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells. *Angiogenesis*, 8(1), 43-51. doi:10.1007/s10456-005-5612-9
213. Matallanas, D., Romano, D., Al-Mulla, F., O'Neill, E., Al-Ali, W., Crespo, P., . . . Kolch, W. (2011). Mutant K-Ras activation of the proapoptotic MST2 pathway is antagonized by wild-type K-Ras. *Mol Cell*, 44(6), 893-906. doi:10.1016/j.molcel.2011.10.016
214. Matsumoto, H. (2017). Molecular and cellular events during blastocyst implantation in the receptive uterus: clues from mouse models. *J Reprod Dev*, 63(5), 445-454. doi:10.1262/jrd.2017-047
215. Matsuoka, A., Kizuka, F., Lee, L., Tamura, I., Taniguchi, K., Asada, H., . . . Sugino, N. (2010). Progesterone increases manganese superoxide dismutase expression via a cAMP-dependent signaling mediated by noncanonical Wnt5a pathway in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 95(11), E291-299. doi:10.1210/jc.2010-0619
216. Matsuzaki, S., Canis, M., Darcha, C., Dechelotte, P., Pouly, J. L., & Bruhat, M. A. (1999). Fibrogenesis in peritoneal endometriosis. A semi-quantitative analysis of type-I collagen. *Gynecol Obstet Invest*, 47(3), 197-199. doi:10.1159/000010094
217. Matsuzaki, S., & Darcha, C. (2012). Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis. *Hum Reprod*, 27(3), 712-721. doi:10.1093/humrep/der442
218. Matsuzaki, S., & Darcha, C. (2013a). In vitro effects of a small-molecule antagonist of the Tcf/ss-catenin complex on endometrial and endometriotic cells of patients with endometriosis. *PLOS ONE*, 8(4), e61690. doi:10.1371/journal.pone.0061690

219. Matsuzaki, S., & Darcha, C. (2013b). Involvement of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in the cellular and molecular mechanisms of fibrosis in endometriosis. *PLOS ONE*, 8(10), e76808. doi:10.1371/journal.pone.0076808
220. Matsuzaki, S., Darcha, C., Maleysson, E., Canis, M., & Mage, G. (2010). Impaired down-regulation of E-cadherin and beta-catenin protein expression in endometrial epithelial cells in the mid-secretory endometrium of infertile patients with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 95(7), 3437-3445. doi:10.1210/jc.2009-2713
221. Mauviel, A., Nallet-Staub, F., & Varelas, X. (2012). Integrating developmental signals: a Hippo in the (path)way. *Oncogene*, 31(14), 1743-1756. doi:10.1038/onc.2011.363
222. McConechy, M. K., Ding, J., Senz, J., Yang, W., Melnyk, N., Tone, A. A., . . . Huntsman, D. G. (2014). Ovarian and endometrial endometrioid carcinomas have distinct CTNNB1 and PTEN mutation profiles. *Mod Pathol*, 27(1), 128-134. doi:10.1038/modpathol.2013.107
223. McNeill, H., & Reginensi, A. (2017). Lats1/2 Regulate Yap/Taz to Control Nephron Progenitor Epithelialization and Inhibit Myofibroblast Formation. *J Am Soc Nephrol*, 28(3), 852-861. doi:10.1681/asn.2016060611
224. McPherson, J. P., Tamblyn, L., Elia, A., Migon, E., Shehabeldin, A., Matysiak-Zablocki, E., . . . Hakem, R. (2004). Lats2/Kpm is required for embryonic development, proliferation control and genomic integrity. *Embo j*, 23(18), 3677-3688. doi:10.1038/sj.emboj.7600371
225. Medina, K. L., Strasser, A., & Kincade, P. W. (2000). Estrogen influences the differentiation, proliferation, and survival of early B-lineage precursors. *Blood*, 95(6), 2059.
226. Mehaseb, M. K., Bell, S. C., & Habiba, M. A. (2009). The effects of tamoxifen and estradiol on myometrial differentiation and organization during early uterine development in the CD1 mouse. *Reproduction*, 138(2), 341-350. doi:10.1530/rep-09-0054
227. Mendelson, C. R., & Boggaram, V. (1991). Hormonal control of the surfactant system in fetal lung. *Annu Rev Physiol*, 53, 415-440. doi:10.1146/annurev.ph.53.030191.002215

228. Meng, Z., Moroishi, T., & Guan, K. L. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev*, *30*(1), 1-17. doi:10.1101/gad.274027.115
229. Mericskay, M., Kitajewski, J., & Sassoon, D. (2004). Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. *Development*, *131*(9), 2061-2072. doi:10.1242/dev.01090
230. Miesfeld, J. B., Gestri, G., Clark, B. S., Flinn, M. A., Poole, R. J., Bader, J. R., . . . Link, B. A. (2015). Yap and Taz regulate retinal pigment epithelial cell fate. *Development (Cambridge, England)*, *142*(17), 3021-3032. doi:10.1242/dev.119008
231. Mifflin, R. C., Saada, J. I., Di Mari, J. F., Adegboyega, P. A., Valentich, J. D., & Powell, D. W. (2002). Regulation of COX-2 expression in human intestinal myofibroblasts: mechanisms of IL-1-mediated induction. *Am J Physiol Cell Physiol*, *282*(4), C824-834. doi:10.1152/ajpcell.00388.2001
232. Miller, C., & Sassoon, D. A. (1998). Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Development*, *125*(16), 3201-3211.
233. Mohamed, O. A., Jonnaert, M., Labelle-Dumais, C., Kuroda, K., Clarke, H. J., & Dufort, D. (2005). Uterine Wnt/beta-catenin signaling is required for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(24), 8579-8584. doi:10.1073/pnas.0500612102
234. Molyneaux, K. A., Stallock, J., Schaible, K., & Wylie, C. (2001). Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev Biol*, *240*(2), 488-498. doi:10.1006/dbio.2001.0436
235. Molyneaux, K. A., Zinszner, H., Kunwar, P. S., Schaible, K., Stebler, J., Sunshine, M. J., . . . Lehmann, R. (2003). The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development*, *130*(18), 4279-4286. doi:10.1242/dev.00640
236. Morcel, K., Camborieux, L., & Guerrier, D. (2007). Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome. *Orphanet J Rare Dis*, *2*, 13. doi:10.1186/1750-1172-2-13
237. Morgan, T. H., Bridges, C. B., Schultz, J., & Schultz, J. (1936). Constitution of the germinal material in relation to heredity. *Yearbook of the Carnegie Institution of Washington*, *35*, 289-297.

238. 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. *Mol Cell Biol*, 26(1), 77-87. doi:10.1128/mcb.26.1.77-87.2006
239. Mosavat, M., Mohamed, M., & Mirsanjari, M. O. (2013). Effect of exercise on reproductive hormones in female athletes.
240. Murali, R., Soslow, R. A., & Weigelt, B. (2014). Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *Lancet Oncol*, 15(7), e268-278. doi:10.1016/s1470-2045(13)70591-6
241. Myers, M., Britt, K. L., Wreford, N. G., Ebling, F. J., & Kerr, J. B. (2004). Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction*, 127(5), 569-580. doi:10.1530/rep.1.00095
242. Naillat, F., Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Pietila, I., Sormunen, R., Jokela, T., Shan, J., & Vainio, S. J. (2010). Wnt4/5a signalling coordinates cell adhesion and entry into meiosis during presumptive ovarian follicle development. *Hum Mol Genet*, 19(8), 1539-1550. doi:10.1093/hmg/ddq027
243. Naillat, F., Yan, W., Karjalainen, R., Liakhovitskaia, A., Samoylenko, A., Xu, Q., . . . Vainio, S. J. (2015). Identification of the genes regulated by Wnt-4, a critical signal for commitment of the ovary. *Exp Cell Res*, 332(2), 163-178. doi:10.1016/j.yexcr.2015.01.010
244. Namiki, T., Ito, J., & Kashiwazaki, N. (2018). Molecular mechanisms of embryonic implantation in mammals: Lessons from the gene manipulation of mice. *Reprod Med Biol*, 17(4), 331-342. doi:10.1002/rmb2.12103
245. Nguyen, Q., Anders, R. A., Alpini, G., & Bai, H. (2015). Yes-associated protein in the liver: Regulation of hepatic development, repair, cell fate determination and tumorigenesis. *Dig Liver Dis*, 47(10), 826-835. doi:10.1016/j.dld.2015.05.011
246. Ni, L., Li, S., Yu, J., Min, J., Brautigam, C. A., Tomchick, D. R., . . . Luo, X. (2013). Structural basis for autoactivation of human Mst2 kinase and its regulation by RASSF5. *Structure*, 21(10), 1757-1768. doi:10.1016/j.str.2013.07.008
247. Ni, N., & Li, Q. (2017). TGFbeta superfamily signaling and uterine decidualization. *Reprod Biol Endocrinol*, 15(1), 84. doi:10.1186/s12958-017-0303-0

248. Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *13*(12), 767-779. doi:10.1038/nrm3470
249. Nightingale, J., Patel, S., Suzuki, N., Buxton, R., Takagi, K. I., Suzuki, J., . . . Zhang, Z. (2004). Oncostatin M, a cytokine released by activated mononuclear cells, induces epithelial cell-myofibroblast transdifferentiation via Jak/Stat pathway activation. *J Am Soc Nephrol*, *15*(1), 21-32.
250. Nishinaka, K., & Fukuda, Y. (1991). Changes in extracellular matrix materials in the uterine myometrium of rats during pregnancy and postparturition. *Acta Pathol Jpn*, *41*(2), 122-132.
251. Nishiyama, Y., Hirota, T., Morisaki, T., Hara, T., Marumoto, T., Iida, S., . . . Saya, H. (1999). A human homolog of Drosophila warts tumor suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. *FEBS Lett*, *459*(2), 159-165. doi:10.1016/s0014-5793(99)01224-7
252. Norian, J. M., Malik, M., Parker, C. Y., Joseph, D., Leppert, P. C., Segars, J. H., & Catherino, W. H. (2009). Transforming growth factor beta3 regulates the versican variants in the extracellular matrix-rich uterine leiomyomas. *Reprod Sci*, *16*(12), 1153-1164. doi:10.1177/1933719109343310
253. Nusse, R., Brown, A., Papkoff, J., Scambler, P., Shackleford, G., McMahon, A., . . . Varmus, H. (1991). A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell*, *64*(2), 231. doi:10.1016/0092-8674(91)90633-a
254. O'Brien, J. E., Peterson, T. J., Tong, M. H., Lee, E. J., Pfaff, L. E., Hewitt, S. C., . . . Jameson, J. L. (2006). Estrogen-induced proliferation of uterine epithelial cells is independent of estrogen receptor alpha binding to classical estrogen response elements. *J Biol Chem*, *281*(36), 26683-26692. doi:10.1074/jbc.M601522200
255. Olson, D. M. (2003). The role of prostaglandins in the initiation of parturition. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, *17*(5), 717-730.
256. Orvis, G. D., & 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
257. Ottolenghi, C., Pelosi, E., Tran, J., Colombino, M., Douglass, E., Nedorezov, T., . . . Schlessinger, D. (2007). Loss of Wnt4 and Foxl2 leads to female-to-male sex reversal

- extending to germ cells. *Hum Mol Genet*, 16(23), 2795-2804. doi:10.1093/hmg/ddm235
258. Ozhan, G., & Weidinger, G. (2015). Wnt/ β -catenin signaling in heart regeneration. *Cell regeneration (London, England)*, 4(1), 3-3. doi:10.1186/s13619-015-0017-8
259. Pacey, A. A., & Suarez, S. S. (2005). Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, 12(1), 23-37. doi:10.1093/humupd/dmi047
260. Pandya, I. J., & Cohen, J. (1985). The leukocytic reaction of the human uterine cervix to spermatozoa. *Fertil Steril*, 43(3), 417-421.
261. Pantalacci, S., Tapon, N., & Leopold, P. (2003). The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in *Drosophila*. *Nat Cell Biol*, 5(10), 921-927. doi:10.1038/ncb1051
262. Parada, C., Li, J., Iwata, J., Suzuki, A., & Chai, Y. (2013). CTGF mediates Smad-dependent transforming growth factor β signaling to regulate mesenchymal cell proliferation during palate development. *Molecular and Cellular Biology*, 33(17), 3482-3493. doi:10.1128/MCB.00615-13
263. Paria, B. C., Huet-Hudson, Y. M., & Dey, S. K. (1993). Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(21), 10159-10162. doi:10.1073/pnas.90.21.10159
264. Paria, B. C., Tan, J., Lubahn, D. B., Dey, S. K., & Das, S. K. (1999). Uterine decidual response occurs in estrogen receptor-alpha-deficient mice. *Endocrinology*, 140(6), 2704-2710. doi:10.1210/endo.140.6.6825
265. Park, H. W., Kim, Y. C., Yu, B., Moroishi, T., Mo, J. S., Plouffe, S. W., . . . Guan, K. L. (2015). Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ. *Cell*, 162(4), 780-794. doi:10.1016/j.cell.2015.07.013
266. Park, J., & Jeong, S. (2015). Wnt activated beta-catenin and YAP proteins enhance the expression of non-coding RNA component of RNase MRP in colon cancer cells. *Oncotarget*, 6(33), 34658-34668. doi:10.18632/oncotarget.5778
267. Parr, B. A., & McMahon, A. P. (1998). Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature*, 395(6703), 707-710. doi:10.1038/27221

268. Pavlova, A., Boutin, E., Cunha, G., & Sassoon, D. (1994). Msx1 (Hox-7.1) in the adult mouse uterus: cellular interactions underlying regulation of expression. *Development*, *120*(2), 335-345.
269. Pawar, S., Laws, M. J., Bagchi, I. C., & Bagchi, M. K. (2015). Uterine Epithelial Estrogen Receptor-alpha Controls Decidualization via a Paracrine Mechanism. *Mol Endocrinol*, *29*(9), 1362-1374. doi:10.1210/me.2015-1142
270. Pazhohan, A., Amidi, F., Akbari-Asbagh, F., Seyedrezazadeh, E., Farzadi, L., Khodarahmin, M., . . . Sobhani, A. (2018). The Wnt/beta-catenin signaling in endometriosis, the expression of total and active forms of beta-catenin, total and inactive forms of glycogen synthase kinase-3beta, WNT7a and DICKKOPF-1. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, *220*, 1-5. doi:10.1016/j.ejogrb.2017.10.025
271. Pećina-Slaus, N. (2010). Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review. *Cancer cell international*, *10*, 22-22. doi:10.1186/1475-2867-10-22
272. Pei, T., Huang, X., Long, Y., Duan, C., Liu, T., Li, Y., & Huang, W. (2019). Increased expression of YAP is associated with decreased cell autophagy in the eutopic endometrial stromal cells of endometriosis. *Mol Cell Endocrinol*, *491*, 110432. doi:10.1016/j.mce.2019.04.012
273. Pei, Y., Brun, S. N., Markant, S. L., Lento, W., Gibson, P., Taketo, M. M., . . . Wechsler-Reya, R. J. (2012). WNT signaling increases proliferation and impairs differentiation of stem cells in the developing cerebellum. *Development*, *139*(10), 1724-1733. doi:10.1242/dev.050104
274. Peluso, J. J., England-Charlesworth, C., Bolender, D. L., & Steger, R. W. (1980). Ultrastructural alterations associated with the initiation of follicular atresia. *Cell Tissue Res*, *211*(1), 105-115.
275. Peng, C., Zhang, X., Wang, Y., Li, L., Wang, Q., & Zheng, J. (2012). Expression and prognostic significance of wnt7a in human endometrial carcinoma. *Obstetrics and gynecology international*, *2012*, 134962. doi:10.1155/2012/134962
276. Philibert, P., Biason-Lauber, A., Gueorguieva, I., Stuckens, C., Pienkowski, C., Lebon-Labich, B., . . . Sultan, C. (2011). Molecular analysis of WNT4 gene in four adolescent girls with mullerian duct abnormality and hyperandrogenism (atypical Mayer-

- Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome). *Fertil Steril*, 95(8), 2683-2686. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.01.152
277. Philibert, P., Biason-Lauber, A., Rouzier, R., Pienkowski, C., Paris, F., Konrad, D., . . . Sultan, C. (2008). Identification and functional analysis of a new WNT4 gene mutation among 28 adolescent girls with primary amenorrhea and mullerian duct abnormalities: a French collaborative study. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(3), 895-900. doi:10.1210/jc.2007-2023
278. Piccolo, S., Dupont, S., & Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev*, 94(4), 1287-1312. doi:10.1152/physrev.00005.2014
279. Piersma, B., Bank, R. A., & Boersema, M. (2015). Signaling in Fibrosis: TGF-beta, WNT, and YAP/TAZ Converge. *Front Med (Lausanne)*, 2, 59. doi:10.3389/fmed.2015.00059
280. Piprek, R. P., Kloc, M., & Kubiak, J. Z. (2016). Early Development of the Gonads: Origin and Differentiation of the Somatic Cells of the Genital Ridges. In R. P. Piprek (Ed.), *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development* (pp. 1-22). Cham: Springer International Publishing.
281. Plant, T. M., Zeleznik, A. J., Albertini, D. F., Goodman, R. L., Herbison, A. E., McCarthy, M. M., . . . Richards, J. S. (2015). *Knobil and Neill's physiology of reproduction* (Fourth edition.. ed.): Amsterdam : Elsevier/Academic Press.
282. Pobbati, A. V., & Hong, W. (2013). Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers. *Cancer Biol Ther*, 14(5), 390-398. doi:10.4161/cbt.23788
283. Praskova, M., Khoklatchev, A., Ortiz-Vega, S., & Avruch, J. (2004). Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras. *Biochem J*, 381(Pt 2), 453-462. doi:10.1042/bj20040025
284. Praskova, M., Xia, F., & Avruch, J. (2008). MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. *Curr Biol*, 18(5), 311-321. doi:10.1016/j.cub.2008.02.006
285. Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Shan, J., Railo, A., Heinonen, K. M., Miinalainen, I., Yan, W., . . . Vainio, S. J. (2014). Wnt4, a pleiotropic signal for controlling cell polarity, basement membrane integrity, and antimullerian hormone expression during oocyte

- maturation in the female follicle. *FASEB J*, 28(4), 1568-1581. doi:10.1096/fj.13-233247
286. Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Skovorodkin, I., Xu, Q., Miinalainen, I., Shan, J., & Vainio, S. J. (2016). Wnt4 coordinates directional cell migration and extension of the Mullerian duct essential for ontogenesis of the female reproductive tract. *Hum Mol Genet*, 25(6), 1059-1073. doi:10.1093/hmg/ddv621
287. Quinones-Jenab, V., Jenab, S., Ogawa, S., Adan, R. A., Burbach, J. P., & Pfaff, D. W. (1997). Effects of estrogen on oxytocin receptor messenger ribonucleic acid expression in the uterus, pituitary, and forebrain of the female rat. *Neuroendocrinology*, 65(1), 9-17. doi:10.1159/000127160
288. Rachfal, A. W., & Brigstock, D. R. (2003). Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatol Res*, 26(1), 1-9.
289. Ramathal, C. Y., Bagchi, I. C., Taylor, R. N., & Bagchi, M. K. (2010). Endometrial decidualization: of mice and men. *Semin Reprod Med*, 28(1), 17-26. doi:10.1055/s-0029-1242989
290. Ramos-Solano, M., Meza-Canales, I. D., Torres-Reyes, L. A., Alvarez-Zavala, M., Alvarado-Ruiz, L., Rincon-Orozco, B., . . . Aguilar-Lemarroy, A. (2015). Expression of WNT genes in cervical cancer-derived cells: Implication of WNT7A in cell proliferation and migration. *Exp Cell Res*, 335(1), 39-50. doi:10.1016/j.yexcr.2015.05.001
291. Reardon, S. N., King, M. L., MacLean, J. A., 2nd, Mann, J. L., DeMayo, F. J., Lydon, J. P., & Hayashi, K. (2012). CDH1 is essential for endometrial differentiation, gland development, and adult function in the mouse uterus. *Biol Reprod*, 86(5), 141, 141-110. doi:10.1095/biolreprod.112.098871
292. Reginensi, A., Enderle, L., Gregorieff, A., Johnson, R. L., Wrana, J. L., & McNeill, H. (2016). A critical role for NF2 and the Hippo pathway in branching morphogenesis. *Nature Communications*, 7, 12309. doi:10.1038/ncomms12309
293. <https://www.nature.com/articles/ncomms12309#supplementary-information>
294. Reginensi, A., Enderle, L., Gregorieff, A., Johnson, R. L., Wrana, J. L., & McNeill, H. (2016). A critical role for NF2 and the Hippo pathway in branching morphogenesis. *Nat Commun*, 7, 12309. doi:10.1038/ncomms12309

295. Reginensi, A., Scott, R. P., Gregorieff, A., Bagherie-Lachidan, M., Chung, C., Lim, D. S., . . . McNeill, H. (2013). Yap- and Cdc42-dependent nephrogenesis and morphogenesis during mouse kidney development. *PLoS Genet*, *9*(3), e1003380. doi:10.1371/journal.pgen.1003380
296. Richardson, B. E., & 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
297. Robboy, S. J., Kurita, T., Baskin, L., & Cunha, G. R. (2017). New insights into human female reproductive tract development. *Differentiation*, *97*, 9-22. doi:10.1016/j.diff.2017.08.002
298. 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 Interdiscip Rev Dev Biol*, *7*(3), e310. doi:10.1002/wdev.310
299. Roy, D., Angelini, N. L., & Belsham, D. D. (1999). Estrogen directly respresses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in estrogen receptor-alpha (ERalpha)- and ERbeta-expressing GT1-7 GnRH neurons. *Endocrinology*, *140*(11), 5045-5053. doi:10.1210/endo.140.11.7117
300. Rudolf, A., Schirwis, E., Giordani, L., Parisi, A., Lepper, C., Taketo, M. M., & Le Grand, F. (2016). beta-Catenin Activation in Muscle Progenitor Cells Regulates Tissue Repair. *Cell Rep*, *15*(6), 1277-1290. doi:10.1016/j.celrep.2016.04.022
301. Ryon, J., Bendickson, L., & Nilsen-Hamilton, M. (2002). High expression in involuting reproductive tissues of uterocalin/24p3, a lipocalin and acute phase protein. *Biochem J*, *367*(Pt 1), 271-277. doi:10.1042/bj20020026
302. Sakai, N., Nakamura, M., Lipson, K. E., Miyake, T., Kamikawa, Y., Sagara, A., . . . Wada, T. (2017). Inhibition of CTGF ameliorates peritoneal fibrosis through suppression of fibroblast and myofibroblast accumulation and angiogenesis. *Scientific Reports*, *7*(1), 5392. doi:10.1038/s41598-017-05624-2
303. Salleh, N., & Giribabu, N. (2014). Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception. *ScientificWorldJournal*, *2014*, 201514. doi:10.1155/2014/201514

304. Sandra, O. (2016). Hormonal control of implantation. *Ann Endocrinol (Paris)*, 77(2), 63-66. doi:10.1016/j.ando.2016.04.013
305. Sasaki, H. (2017). Roles and regulations of Hippo signaling during preimplantation mouse development. *Development, Growth & Differentiation*, 59(1), 12-20. doi:10.1111/dgd.12335
306. Sassoon, D. (1999). Wnt genes and endocrine disruption of the female reproductive tract: a genetic approach. *Mol Cell Endocrinol*, 158(1-2), 1-5.
307. Schafer, S. T., Han, J., Pena, M., von Bohlen Und Halbach, O., Peters, J., & Gage, F. H. (2015). The Wnt adaptor protein ATP6AP2 regulates multiple stages of adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*, 35(12), 4983-4998. doi:10.1523/JNEUROSCI.4130-14.2015
308. Schatten, H. (2008). The mammalian centrosome and its functional significance. *Histochemistry and cell biology*, 129(6), 667-686. doi:10.1007/s00418-008-0427-6
309. Schmidt, E. E., Taylor, D. S., Prigge, J. R., Barnett, S., & Capecchi, M. R. (2000). Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13702-13707. doi:10.1073/pnas.240471297
310. Schubert, H. J., Taylor, U., Zerbe, H., Waberski, D., Hunter, R., & Rath, D. (2008). Immunological responses to semen in the female genital tract. *Theriogenology*, 70(8), 1174-1181. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.07.020
311. Semprini, S., Troup, T. J., Kotelevtseva, N., King, K., Davis, J. R. E., Mullins, L. J., . . . Mullins, J. J. (2007). Cryptic loxP sites in mammalian genomes: genome-wide distribution and relevance for the efficiency of BAC/PAC recombineering techniques. *Nucleic acids research*, 35(5), 1402-1410. doi:10.1093/nar/gkl1108
312. SF, G. (2000). Chromosomal Sex Determination in Mammals. In *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
313. Shao, X., & Wei, X. (2018). FOXP1 enhances fibrosis via activating Wnt/beta-catenin signaling pathway in endometriosis. *Am J Transl Res*, 10(11), 3610-3618.
314. Sharma, R. P., & Chopra, V. L. (1976). Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*, 48(2), 461-465. doi:10.1016/0012-1606(76)90108-1

315. Sharma, S., Godbole, G., & Modi, D. (2016). Decidual Control of Trophoblast Invasion. *Am J Reprod Immunol*, 75(3), 341-350. doi:10.1111/aji.12466
316. Shaw, G., & Renfree, M. B. (2014). Wolffian duct development. *Sex Dev*, 8(5), 273-280. doi:10.1159/000363432
317. Shkurupiy, V. A., Obedinskaya, K. S., & Nadeev, A. P. (2011). Morphological study of the main mechanisms of myometrium involution after repeated pregnancies in mice. *Bull Exp Biol Med*, 150(3), 378-382.
318. Shynlova, O., Kwong, R., & Lye, S. J. (2010). Mechanical stretch regulates hypertrophic phenotype of the myometrium during pregnancy. *Reproduction*, 139(1), 247-253. doi:10.1530/rep-09-0260
319. Shynlova, O., Mitchell, J. A., Tsampalieros, A., Langille, B. L., & Lye, S. J. (2004). Progesterone and Gravity Differentially Regulate Expression of Extracellular Matrix Components in the Pregnant Rat Myometrium¹. *Biology of Reproduction*, 70(4), 986-992. doi:10.1095/biolreprod.103.023648
320. Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., . . . Goodfellow, P. N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346(6281), 240-244. doi:10.1038/346240a0
321. Sobral, L. M., Bufalino, A., Lopes, M. A., Graner, E., Salo, T., & Coletta, R. D. (2011). Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A. *Oral Oncol*, 47(9), 840-846. doi:10.1016/j.oraloncology.2011.06.011
322. Soloff, M. S., Cook, D. L., Jr., Jeng, Y. J., & Anderson, G. D. (2004). In situ analysis of interleukin-1-induced transcription of cox-2 and il-8 in cultured human myometrial cells. *Endocrinology*, 145(3), 1248-1254. doi:10.1210/en.2003-1310
323. Sonderegger, S., Pollheimer, J., & Knofler, M. (2010). Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation--review. *Placenta*, 31(10), 839-847. doi:10.1016/j.placenta.2010.07.011
324. Sone, M., Oyama, K., Mohri, Y., Hayashi, R., Clevers, H., & Nishimori, K. (2013). LGR4 expressed in uterine epithelium is necessary for uterine gland development and contributes to decidualization in mice. *FASEB J*, 27(12), 4917-4928. doi:10.1096/fj.13-232215

325. Song, H., Mak, K. K., Topol, L., Yun, K., Hu, J., Garrett, L., . . . Yang, Y. (2010). Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(4), 1431-1436. doi:10.1073/pnas.0911409107
326. Song, Y., Fu, J., Zhou, M., Xiao, L., Feng, X., Chen, H., & Huang, W. (2016). Activated Hippo/Yes-Associated Protein Pathway Promotes Cell Proliferation and Anti-apoptosis in Endometrial Stromal Cells of Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, *101*(4), 1552-1561. doi:10.1210/jc.2016-1120
327. Spencer, T. E., Dunlap, K. A., & Filant, J. (2012). Comparative developmental biology of the uterus: insights into mechanisms and developmental disruption. *Mol Cell Endocrinol*, *354*(1-2), 34-53. doi:10.1016/j.mce.2011.09.035
328. Sroga, J. M., Ma, X., & Das, S. K. (2012). Developmental regulation of decidual cell polyploidy at the site of implantation. *Front Biosci (Schol Ed)*, *4*, 1475-1486.
329. St-Jean, G., Boyer, A., Zamberlam, G., Godin, P., Paquet, M., & Boerboom, D. (2019). Targeted ablation of Wnt4 and Wnt5a in Mullerian duct mesenchyme impedes endometrial gland development and causes partial Mullerian agenesis. *Biol Reprod*, *100*(1), 49-60. doi:10.1093/biolre/iory160
330. 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. *Nat Genet*, *21*(2), 182-186. doi:10.1038/5965
331. Staack, A., Donjacour, A. A., Brody, J., Cunha, G. R., & Carroll, P. (2003). Mouse urogenital development: a practical approach. *Differentiation*, *71*(7), 402-413. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2003.7107004.x>
332. Staal, F. J., Chhatta, A., & Mikkers, H. (2016). Caught in a Wnt storm: Complexities of Wnt signaling in hematopoiesis. *Exp Hematol*, *44*(6), 451-457. doi:10.1016/j.exphem.2016.03.004
333. Stapp, A. D., Gomez, B. I., Gifford, C. A., Hallford, D. M., & Hernandez Gifford, J. A. (2014). Canonical WNT signaling inhibits follicle stimulating hormone mediated steroidogenesis in primary cultures of rat granulosa cells. *PLOS ONE*, *9*(1), e86432. doi:10.1371/journal.pone.0086432

334. Stewart, C. A., Wang, Y., Bonilla-Claudio, M., Martin, J. F., Gonzalez, G., Taketo, M. M., & Behringer, R. R. (2013). CTNNB1 in mesenchyme regulates epithelial cell differentiation during Mullerian duct and postnatal uterine development. *Mol Endocrinol*, 27(9), 1442-1454. doi:10.1210/me.2012-1126
335. Stewart, C. L., Kaspar, P., Brunet, L. J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F., & Abbondanzo, S. J. (1992). Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 359(6390), 76-79. doi:10.1038/359076a0
336. Stewart, E. A., Friedman, A. J., Peck, K., & Nowak, R. A. (1994). Relative overexpression of collagen type I and collagen type III messenger ribonucleic acids by uterine leiomyomas during the proliferative phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 79(3), 900-906. doi:10.1210/jcem.79.3.8077380
337. Strakova, Z., Reed, J., & Ihnatovych, I. (2010). Human transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) is downregulated during decidualization. *Biol Reprod*, 82(6), 1112-1118. doi:10.1095/biolreprod.109.081844
338. Sudol, M. (2010). Newcomers to the WW Domain-Mediated Network of the Hippo Tumor Suppressor Pathway. *Genes Cancer*, 1(11), 1115-1118. doi:10.1177/1947601911401911
339. Sudol, M., Bork, P., Einbond, A., Kastury, K., Druck, T., Negrini, M., . . . Lehman, D. (1995). Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain. *J Biol Chem*, 270(24), 14733-14741. doi:10.1074/jbc.270.24.14733
340. Suneja, G., & Viswanathan, A. (2020). Gynecologic Malignancies. *Hematol Oncol Clin North Am*, 34(1), 71-89. doi:10.1016/j.hoc.2019.08.018
341. Svtelis, A., Gévry, N., & Gaudreau, L. (2009). Chromatin Immunoprecipitation in Mammalian Cells. *Leblanc B., Moss T. (eds) DNA-Protein Interactions. Methods in Molecular Biology™ (Methods and Protocols) Humana Press*, 543.
342. Szeto, S. G., Narimatsu, M., Lu, M., He, X., Sidiqi, A. M., Tolosa, M. F., . . . Yuen, D. A. (2016). YAP/TAZ Are Mechanoregulators of TGF-beta-Smad Signaling and Renal Fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol*, 27(10), 3117-3128. doi:10.1681/asn.2015050499

343. Takase, H. M., & Nusse, R. (2016). Paracrine Wnt/beta-catenin signaling mediates proliferation of undifferentiated spermatogonia in the adult mouse testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(11), E1489-1497. doi:10.1073/pnas.1601461113
344. Tan, J., Raja, S., Davis, M. K., Tawfik, O., Dey, S. K., & Das, S. K. (2002). Evidence for coordinated interaction of cyclin D3 with p21 and cdk6 in directing the development of uterine stromal cell decidualization and polyploidy during implantation. *Mech Dev*, *111*(1-2), 99-113.
345. Tang, C., Takahashi-Kanemitsu, A., Kikuchi, I., Ben, C., & Hatakeyama, M. (2018). Transcriptional Co-activator Functions of YAP and TAZ Are Inversely Regulated by Tyrosine Phosphorylation Status of Parafibromin. *iScience*, *1*, 1-15. doi:10.1016/j.isci.2018.01.003
346. Tang, Y., & Weiss, S. J. (2017). Snail/Slug-YAP/TAZ complexes cooperatively regulate mesenchymal stem cell function and bone formation. *Cell Cycle*, *16*(5), 399-405. doi:10.1080/15384101.2017.1280643
347. Tao, W., Zhang, S., Turenchalk, G. S., Stewart, R. A., St John, M. A., Chen, W., & Xu, T. (1999). Human homologue of the Drosophila melanogaster lats tumour suppressor modulates CDC2 activity. *Nat Genet*, *21*(2), 177-181. doi:10.1038/5960
348. Tapon, N., Harvey, K. F., Bell, D. W., Wahrer, D. C., Schiripo, T. A., Haber, D., & Hariharan, I. K. (2002). salvador Promotes both cell cycle exit and apoptosis in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines. *Cell*, *110*(4), 467-478. doi:10.1016/s0092-8674(02)00824-3
349. Taylor, H. S., Vanden Heuvel, G. B., & 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. *Biol Reprod*, *57*(6), 1338-1345. doi:10.1095/biolreprod57.6.1338
350. Teixeira, J., He, W. W., Shah, P. C., Morikawa, N., Lee, M. M., Catlin, E. A., . . . Donahoe, P. K. (1996). Developmental expression of a candidate mullerian inhibiting substance type II receptor. *Endocrinology*, *137*(1), 160-165. doi:10.1210/endo.137.1.8536608

351. Teo, J. L., & Kahn, M. (2010). The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: A tale of two coactivators. *Adv Drug Deliv Rev*, 62(12), 1149-1155. doi:10.1016/j.addr.2010.09.012
352. Tepekoy, F., Akkoyunlu, G., & Demir, R. (2015). The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation. *J Assist Reprod Genet*, 32(3), 337-346. doi:10.1007/s10815-014-0409-7
353. Tian, J., Yang, F., & Liu, H. (2012, 28-30 May 2012). *TGF-Beta and CTGF Mediated Signal Transduction Pathway and Fibrosis*. Paper presented at the 2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology.
354. Tibbetts, T. A., Mendoza-Meneses, M., O'Malley, B. W., & Conneely, O. M. (1998). Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus. *Biol Reprod*, 59(5), 1143-1152. doi:10.1095/biolreprod59.5.1143
355. Torres, M., Gomez-Pardo, E., Dressler, G. R., & Gruss, P. (1995). Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development*, 121(12), 4057-4065.
356. Treuting, P. M., Dintzis, S. M., & Montine, K. S. (2018). *Comparative anatomy and histology : a mouse, rat and human atlas* (Second edition.. ed.): London : Academic Press, an imprint of Elsevier.
357. Tsoi, M., Morin, M., Rico, C., Johnson, R. L., Paquet, M., Gevry, N., & Boerboom, D. (2019). Lats1 and Lats2 are required for ovarian granulosa cell fate maintenance. *FASEB J*, fj201900609R. doi:10.1096/fj.201900609R
358. Tsujiura, M., Mazack, V., Sudol, M., Kaspar, H. G., Nash, J., Carey, D. J., & Gogoi, R. (2014). Yes-associated protein (YAP) modulates oncogenic features and radiation sensitivity in endometrial cancer. *PLOS ONE*, 9(6), e100974. doi:10.1371/journal.pone.0100974
359. Tsutsumi, R., Masoudi, M., Takahashi, A., Fujii, Y., Hayashi, T., Kikuchi, I., . . . Hatakeyama, M. (2013). YAP and TAZ, Hippo Signaling Targets, Act as a Rheostat for Nuclear SHP2 Function. *Dev Cell*, 26(6), 658-665. doi:<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.08.013>

360. Vainio, S., Heikkila, M., Kispert, A., Chin, N., & McMahon, A. P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, *397*(6718), 405-409. doi:10.1038/17068
361. Vandenberg, A. L., & Sassoon, D. A. (2009). Non-canonical Wnt signaling regulates cell polarity in female reproductive tract development via van gogh-like 2. *Development*, *136*(9), 1559-1570. doi:10.1242/dev.034066
362. Varela-Nallar, L., & Inestrosa, N. C. (2013). Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Front Cell Neurosci*, *7*, 100. doi:10.3389/fncel.2013.00100
363. Varelas, X., Miller, B. W., Sopko, R., Song, S., Gregorieff, A., Fellouse, F. A., . . . Attisano, L. (2010). The Hippo pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Dev Cell*, *18*(4), 579-591. doi:10.1016/j.devcel.2010.03.007
364. 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. *Nat Cell Biol*, *10*(7), 837-848. doi:10.1038/ncb1748
365. Vassilev, A., Kaneko, K. J., Shu, H., Zhao, Y., & DePamphilis, M. L. (2001). TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev*, *15*(10), 1229-1241. doi:10.1101/gad.888601
366. Venkatesan, N., Pini, L., & Ludwig, M. S. (2004). Changes in Smad expression and subcellular localization in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *287*(6), L1342-1347. doi:10.1152/ajplung.00035.2004
367. Vigano, P., Candiani, M., Monno, A., Giacomini, E., Vercellini, P., & Somigliana, E. (2018). Time to redefine endometriosis including its pro-fibrotic nature. *Hum Reprod*, *33*(3), 347-352. doi:10.1093/humrep/dex354
368. Wang, C., Zhu, X., Feng, W., Yu, Y., Jeong, K., Guo, W., . . . Mills, G. B. (2015). Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3 σ sequestering YAP in the cytoplasm. *American journal of cancer research*, *6*(1), 27-37.
369. Wang, H., Eriksson, H. k., & Sahlin, L. (2000). Estrogen Receptors α and β in the Female Reproductive Tract of the Rat During the Estrous Cycle¹. *Biology of Reproduction*, *63*(5), 1331-1340. doi:10.1095/biolreprod63.5.1331

370. Wang, K., Degerny, C., Xu, M., & Yang, X. J. (2009). YAP, TAZ, and Yorkie: a conserved family of signal-responsive transcriptional coregulators in animal development and human disease. *Biochem Cell Biol*, 87(1), 77-91. doi:10.1139/o08-114
371. Wang, Q., Lu, J., Zhang, S., Wang, S., Wang, W., Wang, B., . . . Wang, H. (2013). Wnt6 is essential for stromal cell proliferation during decidualization in mice. *Biol Reprod*, 88(1), 5. doi:10.1095/biolreprod.112.104687
372. Ward, J. M., Elmore, S. A., & Foley, J. F. (2011). Pathology Methods for the Evaluation of Embryonic and Perinatal Developmental Defects and Lethality in Genetically Engineered Mice. *Veterinary Pathology*, 49(1), 71-84. doi:10.1177/0300985811429811
373. Warot, X., Fromental-Ramain, C., Fraulob, V., Chambon, P., & Dolle, P. (1997). Gene dosage-dependent effects of the Hoxa-13 and Hoxd-13 mutations on morphogenesis of the terminal parts of the digestive and urogenital tracts. *Development*, 124(23), 4781-4791.
374. Wasniewski, T., Kiezun, J., Krazinski, B. E., Kowalczyk, A. E., Szostak, B., Wierzbicki, P. M., & Kiewisz, J. (2019). WNT5A gene and protein expression in endometrial cancer. *Folia Histochem Cytobiol*, 57(2), 84-93. doi:10.5603/FHC.a2019.0010
375. Watt, K. I., Judson, R., Medlow, P., Reid, K., Kurth, T. B., Burniston, J. G., . . . Wackerhage, H. (2010). Yap is a novel regulator of C2C12 myogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 393(4), 619-624. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.034
376. Wei, X., Shimizu, T., & Lai, Z. C. (2007). Mob as tumor suppressor is activated by Hippo kinase for growth inhibition in Drosophila. *Embo j*, 26(7), 1772-1781. doi:10.1038/sj.emboj.7601630
377. Welsh, M., Sharpe, R. M., Walker, M., Smith, L. B., & Saunders, P. T. K. (2009). New Insights into the Role of Androgens in Wolffian Duct Stabilization in Male and Female Rodents. *Endocrinology*, 150(5), 2472-2480. doi:10.1210/en.2008-0529
378. Williams, L. S., Demir Eksi, D., Shen, Y., Lossie, A. C., Chorich, L. P., Sullivan, M. E., . . . Layman, L. C. (2017). Genetic analysis of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser

- syndrome in a large cohort of families. *Fertil Steril*, 108(1), 145-151 e142. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.05.017
379. Woods, L., Perez-Garcia, V., & Hemberger, M. (2018). Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth—New Insights From Mouse Models. *Frontiers in Endocrinology*, 9(570). doi:10.3389/fendo.2018.00570
380. Wu, S., Huang, J., Dong, J., & Pan, D. (2003). hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell*, 114(4), 445-456. doi:10.1016/s0092-8674(03)00549-x
381. Wu, S., Liu, Y., Zheng, Y., Dong, J., & Pan, D. (2008). The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev Cell*, 14(3), 388-398. doi:10.1016/j.devcel.2008.01.007
382. Wynn, T. A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*, 214(2), 199-210. doi:10.1002/path.2277
383. Xiao, J. H., Davidson, I., Matthes, H., Garnier, J. M., & Chambon, P. (1991). Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell*, 65(4), 551-568. doi:10.1016/0092-8674(91)90088-g
384. Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R. A., & Yu, W. (1995). Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development*, 121(4), 1053.
385. Yabuta, N., Fujii, T., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Nishiguchi, H., . . . Nojima, H. (2000). Structure, expression, and chromosome mapping of *LATS2*, a mammalian homologue of the *Drosophila* tumor suppressor gene *lats/warts*. *Genomics*, 63(2), 263-270. doi:10.1006/geno.1999.6065
386. Yabuta, N., Okada, N., Ito, A., Hosomi, T., Nishihara, S., Sasayama, Y., . . . Nojima, H. (2007). *Lats2* is an essential mitotic regulator required for the coordination of cell division. *J Biol Chem*, 282(26), 19259-19271. doi:10.1074/jbc.M608562200
387. Yamamoto, A., Omotehara, T., Miura, Y., Takada, T., Yoneda, N., Hirano, T., . . . Hoshi, N. (2018). The mechanisms underlying the effects of AMH on Mullerian duct regression in male mice. *J Vet Med Sci*, 80(4), 557-567. doi:10.1292/jvms.18-0023
388. Yang, Y., Workman, S., & Wilson, M. (2018). The molecular pathways underlying early gonadal development. *J Mol Endocrinol*. doi:10.1530/jme-17-0314

389. Yang, Z., Sun, Z., Liu, H., Ren, Y., Shao, D., Zhang, W., . . . Nie, S. (2015). Connective tissue growth factor stimulates the proliferation, migration and differentiation of lung fibroblasts during paraquat-induced pulmonary fibrosis. *Mol Med Rep*, *12*(1), 1091-1097. doi:10.3892/mmr.2015.3537
390. Yeh, S., Tsai, M.-Y., Xu, Q., Mu, X.-M., Lardy, H., Huang, K.-E., . . . Chang, C. (2002). Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: An *in vivo* model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(21), 13498. doi:10.1073/pnas.212474399
391. Yi, N., Liao, Q. P., Li, T., & Xiong, Y. (2009). Novel expression profiles and invasiveness-related biology function of DKK1 in endometrial carcinoma. *Oncol Rep*, *21*(6), 1421-1427. doi:10.3892/or_00000370
392. Yin, Y., Lin, C., & Ma, L. (2006). Msx2 Promotes Vaginal Epithelial Differentiation and Wolffian Duct Regression and Dampens the Vaginal Response to Diethylstilbestrol. *Molecular Endocrinology*, *20*(7), 1535-1546. doi:10.1210/me.2005-0451
393. Yoshioka, S., King, M. L., Ran, S., Okuda, H., MacLean, J. A., 2nd, McAsey, M. E., . . . Hayashi, K. (2012). WNT7A regulates tumor growth and progression in ovarian cancer through the WNT/beta-catenin pathway. *Mol Cancer Res*, *10*(3), 469-482. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0177
394. Yu, F. X., Zhao, B., & 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
395. 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
396. Yuan, J., Cha, J., Deng, W., Bartos, A., Sun, X., Ho, H. H., . . . Dey, S. K. (2016). Planar cell polarity signaling in the uterus directs appropriate positioning of the crypt for embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(50), E8079-e8088. doi:10.1073/pnas.1614946113

397. Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., . . . He, X. (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*, *438*(7069), 873-877. doi:10.1038/nature04185
398. Zhan, M., Ikeda, J.-I., Wada, N., Hori, Y., Nojima, S., Tahara, S.-I., . . . Morii, E. (2016). Prognostic significance of a component of the Hippo pathway, TAZ, in human uterine endometrioid adenocarcinoma. *Oncology letters*, *11*(6), 3611-3616. doi:10.3892/ol.2016.4483
399. Zhan, M., Ikeda, J. I., Wada, N., Hori, Y., Nojima, S., Tahara, S. I., . . . Morii, E. (2016). Prognostic significance of a component of the Hippo pathway, TAZ, in human uterine endometrioid adenocarcinoma. *Oncol Lett*, *11*(6), 3611-3616. doi:10.3892/ol.2016.4483
400. Zhan, Y., Fujino, A., MacLaughlin, D. T., Manganaro, T. F., Szotek, P. P., Arango, N. A., . . . Donahoe, P. K. (2006). Müllerian inhibiting substance regulates its receptor/SMAD signaling and causes mesenchymal transition of the coelomic epithelial cells early in Müllerian duct regression. *Development*, *133*(12), 2359-2369. doi:10.1242/dev.02383
401. Zhang, L., Ren, F., Zhang, Q., Chen, Y., Wang, B., & Jiang, J. (2008). The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Dev Cell*, *14*(3), 377-387. doi:10.1016/j.devcel.2008.01.006
402. Zhang, L., Xiong, W., Xiong, Y., Liu, H., Li, N., Du, Y., & Liu, Y. (2016). Intracellular Wnt/Beta-Catenin Signaling Underlying 17beta-Estradiol-Induced Matrix Metalloproteinase 9 Expression in Human Endometriosis. *Biol Reprod*, *94*(3), 70. doi:10.1095/biolreprod.115.135574
403. Zhang, L., Xiong, W., Xiong, Y., Liu, H., & Liu, Y. (2016). 17 beta-Estradiol promotes vascular endothelial growth factor expression via the Wnt/beta-catenin pathway during the pathogenesis of endometriosis. *Mol Hum Reprod*, *22*(7), 526-535. doi:10.1093/molehr/gaw025
404. Zhang, Q., Duan, J., Liu, X., & Guo, S. W. (2016). Platelets drive smooth muscle metaplasia and fibrogenesis in endometriosis through epithelial-mesenchymal transition and fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation. *Mol Cell Endocrinol*, *428*, 1-16. doi:10.1016/j.mce.2016.03.015

405. Zhang, S., Chen, L., Wang-Rodriguez, J., Zhang, L., Cui, B., Frankel, W., . . . Kipps, T. J. (2012). The onco-embryonic antigen ROR1 is expressed by a variety of human cancers. *Am J Pathol*, *181*(6), 1903-1910. doi:10.1016/j.ajpath.2012.08.024
406. Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C. Y., & Guan, K. L. (2010). A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev*, *24*(1), 72-85. doi:10.1101/gad.1843810
407. 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 Dev*, *21*(21), 2747-2761. doi:10.1101/gad.1602907
408. 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 Dev*, *22*(14), 1962-1971. doi:10.1101/gad.1664408
409. Zhao, F., Franco, H. L., Rodriguez, K. F., Brown, P. R., Tsai, M. J., Tsai, S. Y., & Yao, H. H. (2017). Elimination of the male reproductive tract in the female embryo is promoted by COUP-TFII in mice. *Science*, *357*(6352), 717-720. doi:10.1126/science.aai9136
410. Zhao, Y., & Potter, S. S. (2001). Functional specificity of the Hoxa13 homeobox. *Development*, *128*(16), 3197.
411. Zhou, D., Medoff, B. D., Chen, L., Li, L., Zhang, X. F., Praskova, M., . . . Avruch, J. (2008). The Nore1B/Mst1 complex restrains antigen receptor-induced proliferation of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(51), 20321-20326. doi:10.1073/pnas.0810773105
412. 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
413. Zhu, C., Li, L., & Zhao, B. (2015). The regulation and function of YAP transcription co-activator. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, *47*(1), 16-28. doi:10.1093/abbs/gmu110

414. Zhu, H., Pan, Y., Jiang, Y., Li, J., Zhang, Y., & Zhang, S. (2019). Activation of the Hippo/TAZ pathway is required for menstrual stem cells to suppress myofibroblast and inhibit transforming growth factor beta signaling in human endometrial stromal cells. *Hum Reprod*, 34(4), 635-645. doi:10.1093/humrep/dez001