

Université de Montréal

Le rôle de LATS1 et de LATS2 dans le développement du cortex surrénalien

Par

Amélie Ménard

Département de pathologie et de microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de l'obtention du grade de *Maitrise es sciences* (M. Sc.) en sciences vétérinaires, option pathologie

Mars 2021

© Amélie Ménard, 2021

Université de Montréal

Département de pathologie et de microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

Le rôle de LATS1 et de LATS2 dans le développement du cortex surrénalien

Présenté par

Amélie Ménard

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Marie-Lou Gaucher

Présidente-rapporteuse

Alexandre Boyer

Directeur

Marie-Odile Benoit-Biancamano

Codirectrice

Gustavo Zamberlam

Membre du jury

Résumé

La voie de signalisation Hippo est une cascade de kinases hautement conservée entre les espèces qui contrôle des processus cellulaires fondamentaux comme la prolifération, l'apoptose et la différenciation. Dans la cascade, les kinases *Large tumor suppressor 1* et 2 (LATS1/2) phosphorylent et inactivent les co-activateurs transcriptionnels *Yes-associated protein* (YAP) et *Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif* (TAZ) pour réguler finement le développement, la taille et l'homéostasie de nombreux tissus. Bien qu'il ait été démontré que YAP/TAZ étaient essentiels au maintien du cortex surrénalien durant la vie adulte, le rôle des kinases en amont n'a jamais été étudié. L'objectif de ce projet était donc d'élucider le rôle de LATS1 et de LATS2 dans le développement corticosurrénalien. Pour ce faire, un modèle de souris *Lats1^{fllox/fllox};Lats2^{fllox/fllox};Nr5a1-cre*, permettant l'inactivation conditionnelle de *Lats1/2* dans les tissus stéroïdiens, a été créé. La caractérisation de ce modèle a révélé que *Lats1/2* étaient indispensables pour maintenir l'identité des cellules adrénocorticales durant le développement embryonnaire. En l'absence de *Lats1/2*, les cellules du cortex acquièrent des propriétés myofibroblastiques et perdent progressivement leur capacité de stéroïdogénèse, causant une insuffisance surrénalienne fatale vers 2 à 3 semaines d'âge chez les deux sexes. Cette transdifférenciation est probablement causée, du moins en partie, par une augmentation de l'activité transcriptionnelle de YAP/TAZ puisqu'une augmentation de l'expression nucléaire de YAP/TAZ et de l'expression de certains gènes cibles de la voie Hippo ont été observées dans les cellules myofibroblastiques. Ces résultats révèlent donc un tout nouveau rôle de la voie Hippo dans le développement du cortex surrénalien.

Mots-clés : Voie Hippo, LATS1, LATS2, YAP, TAZ, glande surrénale, cellules adrénocorticales, développement, souris transgéniques

Abstract

The Hippo signaling pathway is a highly conserved kinase cascade that controls fundamental cellular processes such as proliferation, apoptosis and differentiation. In this cascade, the Large tumor suppressor kinase 1 and 2 (LATS1/2) phosphorylate and inactivate the main downstream effectors, Yes-associated protein (YAP) and Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ), to finely regulate the development, size and homeostasis of several organs. It was recently demonstrated that YAP and TAZ were essential for the maintenance of the adrenal cortex during adult life, but the role of the upstream kinases has never been studied. The objective of the present project was therefore to elucidate the role of LATS1 and LATS2 in adrenocortical development. We generated a *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mouse model in which *Lats1/2* were conditionally inactivated in steroidogenic cells. The characterization of this model revealed that *Lats1/2* were required to maintain proper adrenocortical cell identity during embryonic development. In the absence of *Lats1/2*, adrenocortical cells acquire myofibroblastic properties and lose their steroidogenic capacity, leading to adrenal deficiency and death at 2 to 3 weeks of age. This transdifferentiation is probably caused, at least in part, by an increased transcriptional activity of YAP/TAZ since a stronger nuclear expression of YAP/TAZ and higher expression levels of Hippo target genes were observed in the myofibroblastic population. These results suggest an important novel role of Hippo signaling in adrenal cortex development.

Keywords: Hippo pathway, LATS1, LATS2, YAP, TAZ, adrenal gland, adrenocortical cells, development, transgenic mice

Table des matières

Résumé	3
Abstract.....	4
Table des matières	5
Liste des tableaux.....	9
Liste des figures.....	10
Liste des sigles et abréviations.....	12
Remerciements	18
Introduction	19
Chapitre 1 – Revue de littérature.....	20
1. Glande surrénale.....	20
1.1 Anatomie et histologie de la glande surrénale murine post-natale	20
1.2 Physiologie.....	22
1.2.1 Rôles des hormones stéroïdiennes surrénaliennes.....	22
1.2.1.1 Aldostérone.....	22
1.2.1.2 Glucocorticoïdes	22
1.2.1.3 Androgènes surrénaliens	23
1.2.2 Catécholamines	23
1.2.3 Stéroïdogénèse.....	24
1.2.3.1 Mobilisation du cholestérol	24
1.2.3.2 Transport du cholestérol libre vers la membrane mitochondriale externe (MME)	25
1.2.3.3 Transfert du cholestérol de la MME à la membrane mitochondriale interne (MMI).....	25
1.2.3.4 Transformation du cholestérol en hormones stéroïdiennes	26

1.2.3.5 Synthèse d'aldostérone	26
1.2.3.6 Synthèse de glucocorticoïdes.....	27
1.2.3.7 Synthèse d'androgènes surrénaliens	27
1.3 Développement embryonnaire et maintien de la glande surrénale murine	28
1.3.1 Développement morphologique embryonnaire de la glande surrénale	28
1.3.2 Facteurs et voies de signalisation impliqués dans le développement précoce du cortex surrénalien	29
1.3.2.1 Steroidogenic factor 1 (Sf1 ou Nr5a1).....	29
1.3.2.2 Wilms' tumor suppressor gene 1 (WT1)	31
1.3.2.3 Voie Wnt/ β -caténine dans le développement précoce.....	33
1.3.3 Transition du cortex fœtal au cortex adulte et origine de la capsule.....	35
1.3.4 Développement du cortex définitif	36
1.3.4.1 Sonic hedgehog.....	36
1.3.4.2 Fibroblast growth factors (FGFs).....	38
1.3.4.3 GATA Binding Protein 4 et 6.....	39
1.3.5 Maintien post-natal et zonation du cortex surrénalien	39
1.3.5.1 Zonation de la zG : voie Wnt/ β -caténine	40
1.3.5.2 Zonation de la zF : Voie ACTH/AMPC/PKA	41
1.3.5.3 Antagonisme entre la voie Wnt/ β -caténine et la voie ACTH/AMPC	42
1.3.5.4 Intégration des différentes voies dans l'homéostasie du cortex	42
1.3.5.5 Impact du sexe sur l'homéostasie du cortex.....	44
1.4 Autres effets du dimorphisme sexuel surrénalien.....	45
1.5 Interactions entre le cortex et la médulla	45
1.5.1 Régulation de la différenciation et de la fonction des cellules chromaffines par le cortex surrénalien	46
1.5.2 Régulation de la fonction du cortex par la médulla	46

2. Voie de signalisation Hippo.....	47
2.1 Découverte de la voie Hippo chez la drosophile.....	47
2.2 Voie de signalisation Hippo canonique chez les mammifères.....	48
2.3 Effecteurs de la voie Hippo.....	50
2.3.1 Large tumor suppressor 1 et 2 (LATS1/2).....	50
2.3.1.1 Structure	50
2.3.1.2 Régulation de LATS1/2.....	51
2.3.1.3 Fonctions.....	52
2.3.2 YAP et TAZ	53
2.3.2.1 Structure de YAP et TAZ.....	53
2.3.2.2 Régulation de YAP et TAZ.....	54
2.3.2.3 Gènes cibles de YAP/TAZ.....	55
2.4 Régulation de la voie Hippo.....	56
2.4.1 En amont de la voie.....	56
2.4.1.1 Signaux de stress.....	56
2.4.1.2 Polarité cellulaire et adhésion cellule-cellule.....	56
2.4.1.3 Cycle cellulaire	58
2.4.1.4 Protéines solubles et récepteurs couplés aux protéines G.....	58
2.4.1.5 Mécanotransduction.....	58
2.4.2 Interactions avec d'autres voies de signalisation.....	59
2.4.2.1 Voie de signalisation Wnt/ β -caténine.....	59
2.4.2.2 Voie TGF- β /SMAD	60
2.4.2.3 Intégration des voies TGF- β , WNT et Hippo dans la fibrose	62
2.4.2.4 Autres voies de signalisation.....	63
2.5 Rôles de la voie Hippo dans la glande surrénale	64
Chapitre 2 – Hypothèse et objectif	66

Chapitre 3 – Article	67
3.1 Abstract.....	69
3.2 Introduction	69
3.3 Material and Methods	70
3.4 Results.....	72
3.5 Discussion	77
3.6 Acknowledgements.....	79
3.7 Data availability.....	80
3.8 References	80
3.9 Figures.....	86
3.10 Supplementary Table	94
3.11 Supplementary Figures	95
Chapitre 4 – Discussion	103
4.1 Pourquoi étudier le développement de la glande surrénale?	103
4.2 Retour sur les résultats	104
4.3 Limites et perspectives	105
Chapitre 5 – Conclusion	110
Chapitre 6 – Références bibliographiques	111

Liste des tableaux

Tableau 1. Équivalence des composantes de la voie Hippo entre la drosophile et les mammifères.....49

Article

Table S1. Quantitative RT-qPCR primer sequences.....94

Liste des figures

Figure 1. Histologie de la glande surrénale murine	21
Figure 2. Mobilisation initiale et transport du cholestérol pour la stéroïdogénèse	26
Figure 3. Étapes de la stéroïdogénèse dans le cortex surrénalien	28
Figure 4. Développement embryonnaire et post-natal de la glande surrénale chez la souris.....	29
Figure 5. Voie de signalisation canonique Wnt/ β -caténine.....	34
Figure 6. Voie de signalisation SHH simplifiée	37
Figure 7. Maintien et régénération du cortex surrénalien chez la souris adulte	44
Figure 8. Voie de signalisation canonique Hippo chez la drosophile	48
Figure 9. Voie de signalisation canonique Hippo chez les mammifères	50
Figure 10. Structure simplifiée des kinases LATS1 et LATS2 humaines.....	51
Figure 11. Structure simplifiée des domaines de YAP et TAZ.....	54
Figure 12. Voie de signalisation TGF- β /SMAD	61

Article

Figure 1. Adrenal glands of <i>Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre</i> mice are larger than controls and are histomorphologically abnormal..	86
Figure 2. Efficiency of <i>Lats1</i> and <i>Lats2</i> knockdown in <i>Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre</i> mice.....	87
Figure 3. Progressive appearance of spindle-shaped cells in the adrenal cortex of <i>Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre</i> mice..	88
Figure 4. Reduction of CYP11B1 expression in the adrenal cortex of <i>Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre</i> mice during development.....	89
Figure 5. Progressive reduction of STAR expression in the adrenal cortex of <i>Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre</i> mice during development..	90
Figure 6. Progressive increase of vimentin expression in the adrenal cortex of <i>Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre</i> mice during development.....	91

Figure 7. Progressive increase of α -SMA expression in a subpopulation of adrenocortical cells in *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice..... 92

Figure 8. *Lats1* and *Lats2* deletion causes a decrease in the phosphorylation of YAP and an increase in the expression of YAP and TAZ downstream target genes in *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice..... 93

Figure S1. Adrenal gland failure is responsible for the death of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice... 95

Figure S2. Adrenal glands of female *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice have a phenotype similar to the one observed in male..... 96

Figure S3. Adrenal glands of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice at late stages of development..... 97

Figure S4. Apoptosis is not increased in *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice.. 98

Figure S5. Adrenal cell proliferation in *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice..... 99

Figure S6. Expression of steroidogenic markers is altered in the adrenal glands of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice..... 100

Figure S7. Expression of fibrosis and myofibroblast-specific genes is increased in *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice.. 101

Figure S8. *Lats1* and *Lats2* deletion causes an increase in the nuclear expression of YAP and TAZ and their downstream target genes in *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice..... 102

Liste des sigles et abréviations

17 β HSD5 : 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5
20 α -HSD : 20 α -hydroxystéroïde déshydrogénase
ACTH : Corticotrophine
Ad4BP : Adrenal-4-binding protein
Afp : Alpha Fetoprotein
AKR1B7 : Aldo-keto reductase family 1, member B7
AKT : Protéine kinase B
AMOT : Angiomotine
Amotl2 : Angiomotin Like 2 (Amotl2)
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
Ankrd1 : Ankyrin Repeat Domain 1
Anln : Anillin Actin Binding Protein
APC : Protéine Adenomatous polyposis coli
AR : Récepteur aux androgènes
ASPP1 : Protéine Phosphatase 1 regulatory subunit 13B
AT1R : Récepteur à l'angiotensine II
Axl : AXL Receptor Tyrosine Kinase
BCL9 : B-Cell CLL/Lymphoma 9 Protein
Birc5 : Baculoviral IAP Repeat Containing 5
BOC : Brother of CDO
C-ABL : Abelson tyrosine kinase
CBP : CREB binding protein
CCN1 : Cellular Communication Network Factor
CDK1 : Cyclin-dependant kinase 1
CDK2 : Cyclin-dependant kinase 2
CDO : Cell-adhesion-molecule-related/downregulated by oncogenes
CHK1 : Checkpoint kinase 1
CHK2 : Checkpoint kinase 2
cIAP1 : Cellular Inhibitor of Apoptosis protein 1
CITED2 : CBP/p300 interacting transactivator with ED-rich tail 2

CK1 : Sérine/thréonine caséine kinase 1
Col8a1 : Collagen Type VIII Alpha 1 Chain
CREB : cAMP-responsive element binding protein
CREM : cAMP-responsive element modulator
CRH1R : Corticotropin-releasing hormone type 1 receptor
Ctgf : Connective tissue growth factor
CYB5 : Cytochrome b5
CYP11A1 : Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1
CYP11B1 : 11-beta hydroxylase
CYP11B2 : Cytochrome P450 Family 11 Subfamily B Member 2 ou aldostérone synthase
CYP17A1 : Cytochrome P450 Family 17 Subfamily A Member 1 ou 17 α -hydroxylase/17,20-lyase
CYP21A2 : 21-hydroxylase
Cyr61 : Cysteine Rich Angiogenic Inducer 61
DAB2 : Disabled homolog 2
DAX1 : Dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome
DHEA : Déhydroépiandrostérone
DHEAS : Forme sulfatée du déhydroépiandrostérone
Diaph3 : Diaphanous Related Formin 3
DKK1 : Dickkopf-1
Dpp : Jour post-natal
Dvl : Dishevelled
e15 : Quinzième jour embryonnaire
EGR-1 : Early growth response protein 1
EMT : Transition épithéliale à mésenchymateuse
ERBB4 : EGFR family member v-Erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4
ERK1 : Extracellular signal-regulated kinase 1
ERK2 : Extracellular signal-regulated kinase 2
FAe : Fetal adrenal-specific enhancer
FGF : Fibroblast growth factor
FGFR : Fibroblast growth factor receptor
FOXO1 : Forkhead box protein O1
GABP : GA Binding Protein

GADD34 : Growth Arrest and DNA-damaged protein 34
GATA4 : GATA Binding Protein 4
GATA6 : GATA Binding Protein 6
Gli1 : Glioma-associated oncogen
GR : Récepteur aux glucocorticoïdes
GSK3 : Glycogène synthase kinase 3
H19 : H19 Imprinted Maternally Expressed Transcript
HDL : Lipoprotéine à haute densité
HH : Hedgehog
HMG-CoA : Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase
Hpo : Hippo (chez la drosophile)
HSD3 β 2 : 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase type 2
HSL : Lipase hormonosensible
IGF2 : Insulin-like growth factor2
InhA : Inhibin Subunit Alpha
ITCH : Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase
JNK : c-Jun N-terminal kinase
KIBRA : Kidney and brain protein
LATS1 : Kinase Large tumor suppressor 1
LATS2 : Kinase Large tumor suppressor 2
LDL : Lipoprotéine à faible densité
LDLR : Récepteur de LDL
LEF : Lymphoid enhancer factor
LH : Hormone lutéinisante
LIPA : Lipase acide lysosomale
LRP5 : Low-density lipoprotein-related receptors 5
LRP6 : Low-density lipoprotein-related receptors 6
MAP4K : Mitogen-activated protein kinase
Mats : Mob as tumor suppressor
MC2R : Récepteur de mélanocortine 2
Mcl1 : MCL1 Apoptosis Regulator
MEC : Matrice extra-cellulaire

MME : Membrane mitochondriale externe
MMI : Membrane mitochondriale interne
MOB : Mps one binder 1
MRAP : Protéine MC2R accessoire
MST1 : Kinases mammalian sterile twenty-like 1
MST2 : Kinases mammalian sterile twenty-like 2
NEDD4 : Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4 E3 Ubiquitin protein ligase
NEK1 : Nima-related protein kinase 1
NPC1 : NPC Intracellular Cholesterol Transporter 1
NPC2 : NPC Intracellular Cholesterol Transporter 2
NR0B1 : Nuclear Receptor Subfamily 0 Group B Member 1
Oct4 : Octamer binding protein 4
P450SCC : Cholesterol side chain clivage
PACAP : Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PAG : Primordium adrénogonadique
PBX/HOX : PBX/Homeobox
PBX/PREP : Pre B cell leukemia homeobox 1/Pbx/knotted 1 homeobox 1
PI3-kinase : Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protéine kinase C
PNMT : Phényléthanolamine-N-méthyltransférase
POMC : Proopiomélanocortine
PORCN : Porcupine
PP1A : Protéine phosphatase 1A
PP2A : Protéine phosphatase 2A
PRC2 : Polycomb repressive complex 2
PREF-1 ou DLK1: Protein delta homolog 1 ou Preadipocyte factor-1
Prkar1a : Protein Kinase CAMP-Dependent Type I Regulatory Subunit Alpha
PTCH1 : Patched1
R1 α : Sous-unité régulatrice 1 α de PKA
RAF1 : Raf-1 proto-oncogen serine/threonine kinase
RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

RSPO3 : R-spondin 3
RUNX : Runt-related transcription factor
SARAH : Salvador–Ras association domain family (RASSF)-Hippo
Sav : Salvador
SBE : SMAD binding element
Sd : Scalloped
Sdpr : Serum deprivation-response protein
SF1 : Steroidogenic factor 1
SHH : Sonic hedgehog
SIAH2 : Siah E3 ubiquitin protein ligase 2
SMAD : SMAD family member
SMO : Smoothened
Smurf1 : SMAD Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 1
Smurf2 : SMAD Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 2
Snai2 : Snail Family Transcriptional Repressor 2
SOX2 : SRY-Box Transcription Factor 2
Sox4 : SRY-Box Transcription Factor 4
SR-B1 : Scavenger receptor class B, type 1
SRC : Proto-oncogen c-Src
SREBP : Sterol regulatory element-binding protein
StAR : Steroidogenic acute regulatory protein
STK3 : Serine/threonine kinase 3
STK4 : Serine/threonine kinase 4
SUFU : Suppressor of Fused
SULT2A1 : Sulfotransférase Famille 2A Membre 1
TAOK : Thousand and one amino acid protein kinase
TAZ : Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
TBX5 : T-Box 5
TCF : T-cell factor
TCF21 : Transcription factor 21
TEAD : TEA domain
TGF- β : Transforming growth factor beta

TH : Tyrosine hydroxylase
TSPO : Protéine translocatrice
VDAC : Canal anionique voltage-dépendant
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VGLL4 : Transcription cofactor vestigial-like protein 4
Wnt : Wingless-Type MMTV Integration Site Family
Wnt4 : Wnt Family Member 4
WT1 : Wilms tumor 1
Wts : Warts
WTX : Gène tumoral de Wilm sur le chromosome X
WWP1 : WW Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1
WWTR1 : WW domain-containing transcription regulator protein 1
YAP : Yes-associated protein
Yes : Tyrosine kinase Yes Proto-Oncogene 1
Yki : Yorkie
ZD : Zone définitive
zF : Zone fasciculée
zG : Zone glomérulée
ZNRF3 : Zinc and ring finger 3
zR : Zone réticulée
zX : Zone X
 α -SMA : Alpha smooth muscle actin
 β -TrCP : Ligase E3 β -transducin repeat-containing protein

Remerciements

Merci à mon directeur de recherche, Dr Alexandre Boyer, de m'avoir permis de réaliser ce projet de maîtrise. Merci de m'avoir partagé vos connaissances, votre savoir-faire, votre temps et votre passion contagieuse pour la biologie moléculaire et la recherche tout au long de ma maîtrise. Vous avez toujours cru en moi et en mes projets; votre continuel soutien m'a beaucoup aidé à atteindre mes objectifs académiques et professionnels.

Merci à ma co-directrice, Dre Marie-Odile Benoit-Biancamano, pour vos précieux conseils, pour votre méticulosité, pour votre expertise et pour votre soutien. Je suis très reconnaissante pour toutes les opportunités de projets et de collaborations que vous m'avez offertes, qui ont contribué à faire grandir ma fascination pour la pathologie vétérinaire au point d'en faire mon choix de carrière!

Merci à Adrien, Nour et Marie pour votre temps et pour votre importante contribution à mon projet.

Merci au personnel de l'animalerie et du département de pathologie pour votre constant soutien technique.

Merci à Dr Derek Boerboom, Dr Gustavo Zamberlam, Dr Marilène Paquet et Dr Guillaume St-Jean pour votre aide et vos conseils.

Merci à tous mes collègues au laboratoire pour votre bonne humeur quotidienne. Les étés à Saint-Hyacinthe ont passé très vite en votre agréable compagnie!

Merci à ma famille et à mes proches pour votre écoute, vos encouragements et votre support.

Introduction

La voie de signalisation Hippo a été découverte chez la drosophile il y a plus de deux décennies. C'est une cascade de kinases hautement conservée chez les animaux qui entraîne ultimement la phosphorylation de ses effecteurs, les co-activateurs transcriptionnels YAP et TAZ, et leur inactivation par les kinases LATS1 et LATS2. Ceci permet de contrôler la prolifération, l'apoptose et la différenciation des cellules. La signalisation Hippo est essentielle pour le développement et l'homéostasie de nombreux organes et ses effets sont tissu-dépendants. Des dérèglements de la voie sont responsables de plusieurs pathologies et leur implication dans la formation de tumeurs est désormais bien établie.

Les glandes surrénales sont des glandes endocrines composées d'un cortex externe, qui produit des corticostéroïdes, des minéralocorticoïdes et une petite quantité d'androgènes, et d'une médulla interne qui sécrète des catécholamines. Le cortex prend origine d'une structure embryonnaire appelée le primordium adrénogonadique, qui donne aussi naissance aux gonades. Plusieurs voies de signalisation et facteurs de transcription orchestrent le développement du primordium adrénogonadique, sa séparation en deux primordiums distincts (gonadique et adrénocortical) et la différenciation subséquente de ces précurseurs en tissus matures fonctionnels.

Il a récemment été démontré que YAP et TAZ étaient nécessaires pour le maintien post-natal du cortex surrénalien. En effet, la délétion conditionnelle de *Yap* et *Taz* a engendré une dégénérescence corticale progressive chez les souris mâles adultes. Une autre étude a aussi révélé que YAP et TAZ étaient souvent surexprimés dans les tumeurs adrénocorticales pédiatriques humaines plus agressives. La voie Hippo joue donc un rôle dans l'homéostasie du cortex surrénalien, mais son rôle dans le développement embryonnaire n'a jamais été étudié. L'objectif de ce projet est donc d'élucider le rôle de la voie Hippo dans le développement adrénocortical par la création d'un modèle de souris transgénique permettant l'inactivation des kinases clés de la voie Hippo *Lats1* et *Lats2* dans les cellules stéroïdogéniques.

Chapitre 1 – Revue de littérature

1. Glande surrénale

1.1 Anatomie et histologie de la glande surrénale murine post-natale

Chez les mammifères, les glandes surrénales sont des organes pairés ovoïdes situés au pôle crânial des reins dans l'espace rétropéritonéal. Chez les femelles, elles sont environ 25% plus volumineuses et sont plus opaques à cause d'une plus grande quantité de lipides par rapport aux mâles (1). Chez la souris, la glande est entourée d'une mince capsule fibreuse et contient quatre zones concentriques distinctes : la zone glomérulée (zG), la zone fasciculée (zF) et la zone X (zX), qui forment le cortex, ainsi que la médulla (Figure 1). Il n'y a pas de zone réticulée discernable, contrairement aux humains. Le cortex occupe 80% du volume de la glande et la médulla en occupe 20% (2).

Au niveau microscopique, la zG, qui est la zone la plus externe du cortex, est formée de petites cellules légèrement basophiles avec un noyau relativement gros et un peu de cytoplasme. Elles sont organisées en arcs denses indistincts. Ces cellules contiennent quelques gouttelettes lipidiques périnucléaires de taille uniforme (3). Parmi les marqueurs spécifiques de la zG se retrouvent l'aldostérone synthase (CYP11B2) (4), *Disabled homolog 2* (DAB2) (5), *Protein delta homolog 1* (DLK1 ou PREF-1) (6) et la β -caténine (7). La zF, plus interne, représente environ 70-75% du cortex. Ses cellules sont organisées en colonnes séparées par des capillaires fenestrés qui s'étendent vers la médulla. Elles possèdent un noyau central et un cytoplasme plus éosinophile que la zG, avec de multiples vacuoles lipidiques de tailles variables. Les principaux marqueurs de la zF sont la *11-beta hydroxylase* (CYP11B1) (8) et l'*aldo-keto reductase family 1, member B7* (AKR1B7) (9). La zX, propre à la souris, correspond aux cellules du cortex foetal qui s'accumulent à la jonction cortico-médullaire (10). Ces cellules sont éosinophiles et plus petites que les cellules des autres zones du cortex (11). Elles expriment spécifiquement l'enzyme 20alpha-hydroxystéroïde déshydrogénase (20 α -HSD). Sa fonction est toutefois encore controversée; elle semble être impliquée dans le métabolisme de la progestérone et possiblement des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes (12). Les cellules de la zX commencent à être visibles au huitième jour post-natal (13). Chez les mâles, la zX est beaucoup plus petite et disparaît entièrement à la puberté (environ 40 jours) (14, 15) sous l'effet des androgènes (12), tandis qu'elle disparaît rapidement durant la première gestation (5-

15^e jour) chez la femelle (15, 16). En l'absence de gestation, la zX régresse beaucoup plus lentement, soit vers 3 à 7 mois d'âge (15). Chez l'humain et d'autres espèces, il y a une troisième zone corticale située entre la zF et la médulla appelée zone réticulée (zR). Cette zone produit du déhydroépiandrostérone (DHEA) et son dérivé sulfaté (DHEAS) (17). Les cellules de la zR sont histologiquement similaires à celles de la zF, avec cependant moins de gouttelettes lipidiques et plus de pigments de lipofuscine (18) (Figure 1).

La médulla, située au centre de la glande, est constituée d'une population homogène de cellules chromaffines organisées en amas de tailles variables séparés par des sinusoides. Elles possèdent un noyau central et un cytoplasme basophile contenant un grand nombre de granules sécrétoires lui donnant une apparence finement granulaire. Quelques cellules ganglionnaires y sont disséminées. La médulla peut s'étendre jusqu'à la capsule au niveau du hile (19, 20).

Un plexus artériolaire sous-capsulaire dirige le sang vers le centre de la surrénale par deux types de vaisseaux, soit des sinusoides qui irriguent le cortex et la médulla et des artères médullaires qui se rendent directement dans la médulla (21).

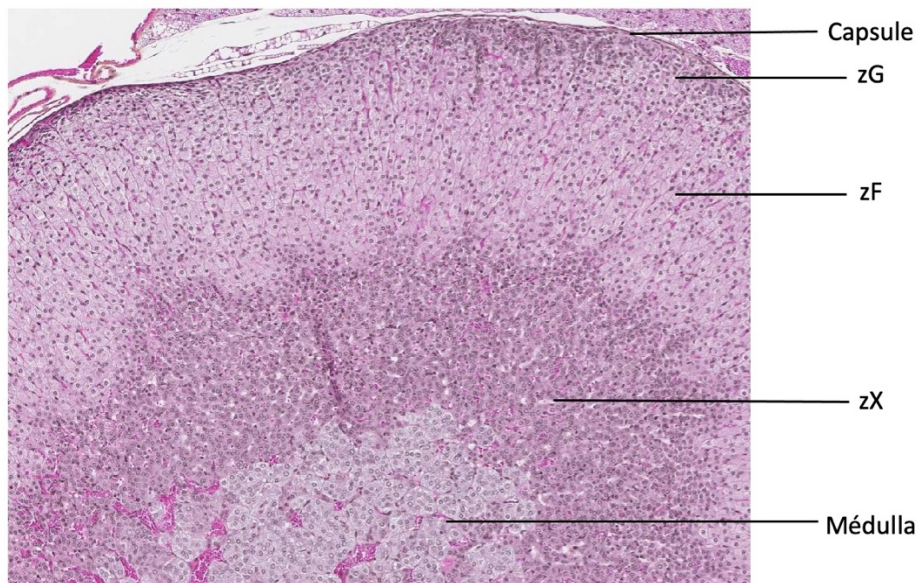


Figure 1. Histologie de la glande surrénale murine.

La glande surrénale provient d'une souris femelle nullipare d'environ 2 mois d'âge. zF : Zone fasciculée, zG : Zone glomérulée, zX : Zone X.

1.2 Physiologie

La glande surrénale est une glande endocrine dont le rôle principal est de produire des hormones essentielles à la survie de l'organisme. Chaque zone de la glande produit différentes hormones selon son arsenal enzymatique.

1.2.1 Rôles des hormones stéroïdiennes surrénaliennes

1.2.1.1 Aldostérone

L'aldostérone est une hormone stéroïdienne produite par la zG en réponse à l'angiotensine II (système rénine-angiotensine), à une augmentation du potassium sérique, à une déficience en sodium, à la corticotrophine (ACTH) et à plusieurs autres facteurs paracrines. Son rôle principal est de réguler le volume extracellulaire et la pression sanguine en contrôlant l'équilibre sodium-potassium. Elle contribue également à l'équilibre acido-basique (22).

Le système rénine-angiotensine est un régulateur important de la synthèse d'aldostérone. Lorsque le débit sanguin rénal ou la concentration sérique de sodium sont diminués, l'appareil juxtaglomérulaire rénal sécrète de la rénine (23, 24). Celle-ci clive l'angiotensinogène circulant synthétisé par le foie pour produire de l'angiotensine I, qui sera convertie en angiotensine II au poumon. Cette dernière a un effet direct sur le système vasculaire au niveau artériel et induit également la synthèse d'aldostérone par les glandes surrénales en stimulant la transcription de *Cyp11b2* (25).

L'aldostérone agit en se liant initialement à un récepteur minéralocorticoïde cytoplasmique pour former un complexe qui se rend au noyau pour réguler la transcription. Ceci résulte en une augmentation de la réabsorption de sodium et de l'excrétion de potassium et de protons (H⁺) dans l'épithélium du tubule contourné distal (22) par l'activation de canaux sodiques épithéliaux apicaux et de pompes Na⁺/K⁺-ATPase basolatérales (26). Les récepteurs minéralocorticoïdes sont aussi exprimés dans d'autres tissus tels que le système cardiovasculaire (cœur (27), les cellules endothéliales (28, 29), les muscles lisses (29, 30)) et les cellules mésangiales du rein (31).

1.2.1.2 Glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdiennes produites par la zF en réponse au stress et de manière circadienne sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. L'ACTH produite par l'hypophyse est le principal stimulus et agit sur les cellules de la zF via un récepteur couplé à une protéine G appelé *Melanocortin 2 receptor* (MC2R). La plupart des tissus contient des récepteurs aux

glucocorticoïdes (GR). Ils sont essentiels à la survie et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques tels que le métabolisme, l'immunité, l'inflammation, la croissance squelettique, le système cardiovasculaire, la reproduction et la cognition (32, 33). Leurs principales fonctions sont d'augmenter la concentration de glucose sanguin via la néoglucogenèse, faciliter le catabolisme des protéines, des lipides et des hydrates de carbone, moduler le système immunitaire et stimuler les enzymes nécessaires à la synthèse de catécholamines par la médulla (34). Les glucocorticoïdes jouent aussi un rôle crucial dans la gestation et le développement fœtal. Au début de la gestation, ils sont essentiels à l'implantation de l'embryon, à la décidualisation de la paroi utérine et à la suppression de l'immunité maternelle (35, 36). Vers la fin de la gestation, les surrénales fœtales commencent à produire des glucocorticoïdes en circulation (24 semaines chez l'humain, jour embryonnaire 15 (e15) chez la souris); cette augmentation est cruciale pour la maturation finale de plusieurs organes en préparation à la vie post-natale, particulièrement les poumons (37, 38). Les souris déficientes en récepteurs aux glucocorticoïdes (*GR null*) meurent d'insuffisance respiratoire à la naissance (39).

1.2.1.3 Androgènes surrénaliens

Les glandes surrénales des rongeurs ne produisent pas d'androgènes, contrairement à d'autres espèces comme l'humain. La zone réticulée (zR) sécrète plusieurs androgènes, soit la DHEA, la DHEAS (le plus abondant), l'androsténone et la 11 β -hydroxyandrosténone (40). Ces molécules sont beaucoup moins puissantes que la testostérone ou la dihydrotestostérone ; elles ne se lient que très peu aux récepteurs d'androgènes (AR) et possèdent une faible capacité d'activation. Elles servent principalement de précurseurs pouvant être convertis en androgènes plus puissants dans les tissus périphériques (ex. glandes sébacées, prostate, etc.) (41). Chez l'humain, la zR est fonctionnelle à partir de 6 à 8 ans, ce qui coïncide avec l'expression du cytochrome b5 (CYB5), qui augmente l'activité de l'enzyme CYP17A1 (42).

1.2.2 Catécholamines

Les cellules chromaffines de la médulla synthétisent et sécrètent des catécholamines dans la circulation en réponse à une activation du système nerveux sympathique afin d'induire une réponse rapide au stress pour assurer la survie de l'organisme. Les deux principales catécholamines sont l'épinéphrine (70-80%) et la norépinéphrine. Ce sont des neurohormones qui interagissent avec les récepteurs adrénergiques. Dans le système cardiovasculaire, leur principale action est d'augmenter la fréquence cardiaque et d'induire une vasoconstriction périphérique pour augmenter le débit et la pression sanguine. Ils causent aussi une piloérection, une bronchodilatation, une relaxation des muscles lisses, une

constriction des sphincters gastro-intestinaux, une mydriase et des changements métaboliques permettant d'augmenter les niveaux sanguins de glucose (glycogénolyse) et d'acides gras libres (43).

1.2.3 Stéroïdogénèse

La stéroïdogénèse regroupe l'ensemble des étapes menant à la synthèse d'hormones stéroïdiennes par le cortex surrénalien. Ce processus complexe inclut la mobilisation du cholestérol, le précurseur de tous les stéroïdes, puis son transfert à la membrane mitochondriale et sa transformation enzymatique en hormones stéroïdiennes.

1.2.3.1 Mobilisation du cholestérol

Le cholestérol est le précurseur commun de toutes les hormones stéroïdiennes. Il est transformé en stéroïdes spécifiques par plusieurs réactions enzymatiques successives et le produit final dépend du type cellulaire. Le cholestérol peut provenir de plusieurs sources : synthèse *de novo*, importation de cholestérol sous forme estérifiée incorporé dans des lipoprotéines à faible densité (LDL) ou haute densité (HDL) ou hydrolyse du cholestérol estérifié stocké dans les gouttelettes lipidiques (21, 44).

Dans la surrénale, la synthèse *de novo* entre en jeu surtout lorsque les besoins en stéroïdes sont augmentés (45). Le cholestérol est synthétisé en plusieurs étapes successives à partir d'acétyl-coA qui provient d'une réaction d'oxydation. L'étape limitante est catabolisée par l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoA), dont l'expression est régulée par un facteur de transcription appelé *sterol-regulatory element-binding protein* (SREBP) (46).

Chez l'humain, la majorité du cholestérol utilisé dans la surrénale provient de l'importation de cholestérol estérifié associé aux LDL (47). Les LDL se lient aux récepteurs de LDL (LDLR) et sont internalisés par endocytose dans la cellule. Le cholestérol estérifié est ensuite hydrolysé par la lipase acide lysosomale (LIPA) dans les endosomes tardifs afin de produire du cholestérol libre. La protéine *NPC Intracellular Cholesterol Transporter 2* (NPC2) facilite l'hydrolyse tandis que *NPC Intracellular Cholesterol Transporter 1* (NPC1) facilite l'exportation du cholestérol libre de l'endosome tardif (21, 48).

Contrairement aux LDL, l'incorporation du cholestérol dans la cellule via les HDL ne se fait pas par endocytose, mais par un canal non-aqueux appelé *Scavenger receptor class B, type 1* (SR-B1) situé dans la membrane cytoplasmique. Le HDL se lie à SR-B1, relâche son cholestérol estérifié et retourne dans la circulation (49). Celui-ci peut être directement incorporé dans des gouttelettes lipidiques (50) ou être

hydrolysé en cholestérol libre par la lipase hormonosensible (HSL) (51). Chez les rongeurs, les HDL sont la principale source de cholestérol (52) (Figure 2).

Lors d'une stimulation hormonale aiguë, l'hydrolyse du cholestérol estérifié des gouttelettes lipidiques par la HSL est privilégiée. Cette dernière est activée par l'ACTH via la voie PKA ou l'angiotensine II et elle participe aussi au transport du cholestérol vers la membrane mitochondriale externe (MME) (53).

1.2.3.2 Transport du cholestérol libre vers la membrane mitochondriale externe (MME)

Le cholestérol libre doit atteindre la mitochondrie afin d'entamer la stéroïdogénèse. La mitochondrie ne peut pas entreposer de grandes quantités de cholestérol libre, donc la majorité se trouve dans la MME (54). Le cholestérol atteint la MME par des mécanismes impliquant du transport vésiculaire ou des protéines de liaison solubles (55).

1.2.3.3 Transfert du cholestérol de la MME à la membrane mitochondriale interne (MMI)

Une fois à la MME, le cholestérol libre doit atteindre la MMI. Il s'agit de l'étape limitante de la stéroïdogénèse et la protéine *Steroidogenic acute regulatory protein* (StAR) en est le principal acteur. StAR fait partie d'un complexe protéique associé aux membranes mitochondriales appelé le transduceosome. Ce complexe contient d'autres protéines dont un canal anionique voltage-dépendant (VDAC) et la protéine translocatrice TSPO (56) (Figure 2). Dans la mitochondrie, StAR doit être clivée pour devenir fonctionnelle. En réponse à une stimulation hormonale (ACTH, hormone lutéinisante (LH)), StAR est également phosphorylée, ce qui augmente davantage son activité (57, 58). Le niveau d'activité de StAR est régulé finement par plusieurs voies de signalisation incluant la voie PKA, la protéine kinase C (PKC) et la voie ERK1/2 (59).

Le *knockout* de StAR dans un modèle de souris a engendré une déficience en glucocorticoïdes et une altération sévère de l'architecture surrénalienne avec l'accumulation de lipides (60). Ces changements concordent avec ce qu'on retrouve chez les humains atteints d'hyperplasie surrénalienne lipoïde congénitale, une maladie autosomale récessive létale causée par la perte de fonction de StAR (61).

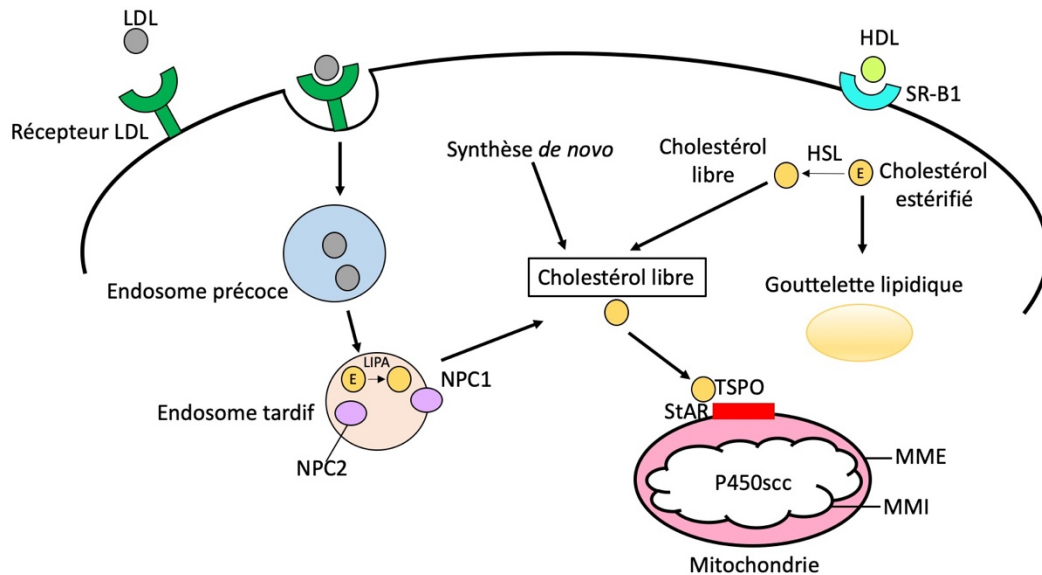


Figure 2. Mobilisation initiale et transport du cholestérol pour la stéroïdogénèse
Modifié de Strauss, Modi et McAllister, 2014 (62) et Miller, 2011 (63)

1.2.3.4 Transformation du cholestérol en hormones stéroïdiennes

Une fois à la MMI, le cholestérol est converti en prégnénolone par l'enzyme CYP11A1 ou P450SCC (*Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1* ou *Cholesterol side chain cleavage*) (40). Il s'agit également d'une étape limitante de la stéroïdogénèse (64). Cette réaction produit aussi de l'isocaproaldéhyde, un métabolite toxique qui sera transformé en dérivés moins toxiques par des aldoses réductases (principalement AKR1B7) ou des aldéhydes déshydrogénases (65, 66). Ensuite, ces produits vont sortir de la mitochondrie et plusieurs réactions catalysées par les enzymes cytochrome P450 et hydroxystéroïdes déshydrogénases vont se succéder afin de produire les hormones stéroïdiennes. Le produit final dépend du type cellulaire, qui exprime un arsenal enzymatique spécifique. Les hormones stéroïdiennes ne peuvent pas être stockées pour une sécrétion immédiate, donc la réponse dépend toujours de la synthèse *de novo* (40).

1.2.3.5 Synthèse d'aldostérone

La synthèse de minéralocorticoïdes se produit dans la zG et nécessite trois enzymes spécifiques. Premièrement, l'enzyme 3β -hydroxystéroïde déshydrogénase type 2 (HSD3 β 2) convertit la prégnénolone en progestérone de manière irréversible (67). Deuxièmement, l'enzyme 21-hydroxylase (CYP21A2 ou P450c21) convertit la progestérone en 11-déoxycorticostérone. Enfin, CYP11B2 (P450c11AS) catalyse les trois dernières étapes, soit la 11 β -hydroxylation, la 18 α hydroxylation et la 18-méthoxylation. La zG

exprime très peu de 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17A1 ou P450c17), qui mène plutôt à la synthèse de cortisol et d'androgènes (68).

1.2.3.6 Synthèse de glucocorticoïdes

Chez l'humain, CYP17A1 catalyse la 17 α -hydroxylation de la prégnénolone et de la progestérone, qui sont transformées en 17-hydroxyprégnénolone et en 17-hydroxyprogestérone respectivement. Par la suite, de manière similaire à la zG, l'enzyme HSD3 β 2 peut transformer la 17-hydroxyprégnénolone en 17-hydroxyprogestérone, qui sera transformé en 11-déoxycortisol par CYP21A2. Finalement, l'enzyme CYP11B1 produit le cortisol et est souvent utilisée comme marqueur de la zF. La corticostérone est aussi produite chez l'humain, mais en très petite quantité (68). La souris est déficiente en CYP17A1, donc elle produit de la corticostérone au lieu du cortisol. La progestérone est hydroxylée en 11-déoxycorticostérone par la 21-hydroxylase comme dans la zG. Puis, l'enzyme CYP11B1 la transforme en corticostérone (68, 69) (Figure 3).

1.2.3.7 Synthèse d'androgènes surrénaliens

Chez l'humain, des androgènes sont produits dans la zR, les deux principaux étant la DHEA et la DHEAS. L'enzyme CYP17A1 effectue la synthèse de DHEA à partir de prégnénolone et d'androsténone à partir de progestérone. C'est l'activité lyase de CYP17A1 qui est impliquée dans la synthèse d'androgènes et non l'activité hydroxylase, qui est plutôt impliquée dans la synthèse de glucocorticoïdes dans la zF. La réaction lyase est environ 10 fois plus importante dans la zF que la zG à cause de la présence d'un cofacteur appelé CYB5a (70). La DHEA est conjuguée en sa forme sulfatée DHEAS par la sulfotransférase SULT2A1 (71). La surrénale est capable de produire une faible quantité de testostérone par conversion d'androsténone par l'enzyme 17 β -hydroxystéroïde déhydrogénase type 5 (17 β HSD5) (Figure 3).

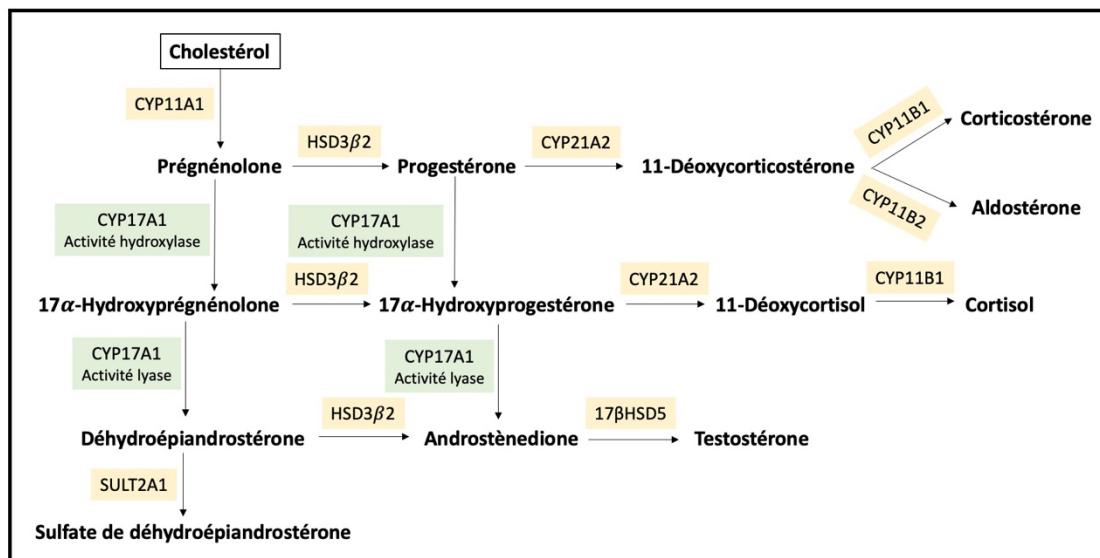


Figure 3. Étapes de la stéroïdogenèse dans le cortex surrénalien

Les enzymes en jaune sont présentes chez les humains et les souris. Les enzymes en vert sont absentes chez les souris. Modifié de Turcu, 2015 (72).

1.3 Développement embryonnaire et maintien de la glande surrénale murine

1.3.1 Développement morphologique embryonnaire de la glande surrénale

Chez la souris, la formation de la glande surrénale débute vers le jour embryonnaire 9.5 (e9.5) par l'épaississement de l'épithélium cœlomique, correspondant à la crête urogénitale (73, 74). Cette population cellulaire forme le primordium adrénogonadique (PAG), qui est le précurseur commun des gonades et des surrénales. Le PAG contient une population mixte de progéniteurs du cortex surrénalien et des cellules somatiques des gonades, qui expriment tous le facteur de transcription *steroidogenic factor-1* (SF1), aussi appelé *Adrenal-4-binding protein* (Ad4BP) (73, 75, 76). Au jour e10.5, le PAG se sépare en deux entités, soit le primordium adrénocortical et le primordium gonadique, qui vont continuer leur différenciation selon différentes voies de signalisation. Les cellules du primordium gonadique migrent dorsolatéralement tandis que celles du primordium adrénocortical, qui expriment plus fortement SF1, migrent dorsomédialement pour se positionner ventrolatéralement à l'aorte dorsale (73, 74). Des cellules dérivées de la crête neurale envahissent le primordium adrénocortical au jour e12.5 et se différencient éventuellement en cellules chromaffines neuroendocrines qui formeront la médulla (77). Au jour e14.5, la glande surrénale devient encapsulée par plusieurs couches de cellules par un processus impliquant

possiblement la condensation des cellules mésenchymateuses adjacentes (mésoderme intermédiaire) (38, 78). Durant cette période, la vascularisation et l'innervation se développent. Les différentes zones du cortex définitif se forment après l'encapsulation et cette étape est complétée après la naissance (79). Leur différenciation commence en fait à e11.5-12.5, lorsque l'expression des enzymes stéroïdogéniques de base (*cholesterol side chain cleavage enzyme* ; CYP11A1) et l'accumulation de mitochondries et de biotine endogène deviennent détectables (80, 81). L'expression de l'enzyme terminale CYP11B1 est détectable à e13.5 tandis que l'expression de CYP11B2 débute autour de 1 jour post-natal (1 dpp) chez la souris (82, 83) (Figure 4).

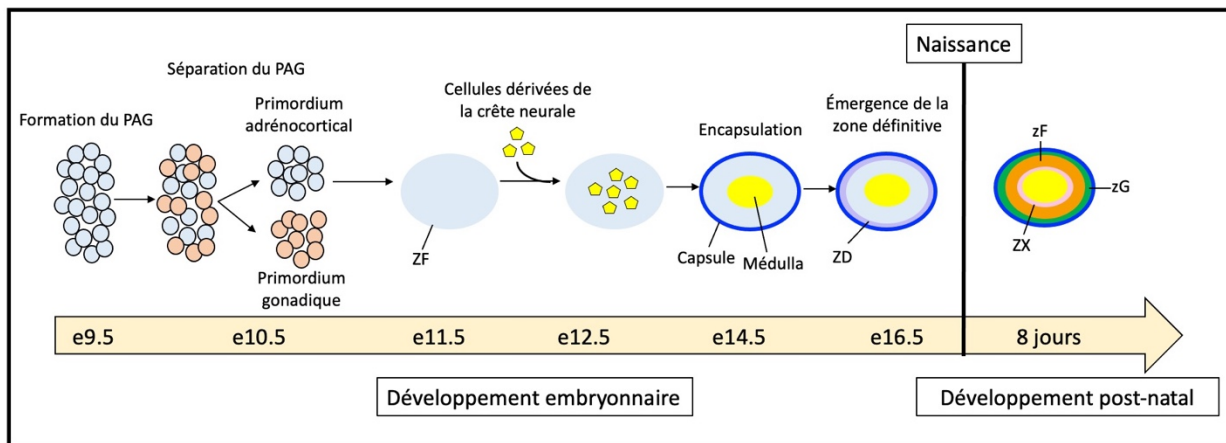


Figure 4. Développement embryonnaire et post-natal de la glande surrénale chez la souris
La ligne du temps n'est pas à l'échelle. ZF : zone foétale, ZD : zone définitive. Modifié de Xing, 2015 (84).

1.3.2 Facteurs et voies de signalisation impliqués dans le développement précoce du cortex surrénalien

Le développement du cortex surrénalien est un processus complexe qui est régulé par plusieurs voies de signalisation entrant en jeu à des moments précis. L'étude de patients humains affectés par des mutations et des modèles de souris transgéniques de perte ou gain de fonctions ont permis de mettre en lumière plusieurs acteurs clés qui seront présentés dans les prochaines sections.

1.3.2.1 Steroidogenic factor 1 (*Sf1* ou *Nr5a1*)

SF1 est un facteur de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires orphelins (75, 85) qui est exprimé dans le cortex surrénalien, les cellules de Leydig, de Sertoli foétales, de la thèque, de la granulosa et dans le corpus luteum (86). Il régule l'expression de plusieurs gènes codant pour des

enzymes stéroïdogéniques et est un régulateur majeur de la stéroïdogénèse et de la différenciation des cellules stéroïdogéniques. Il n'est donc pas surprenant qu'il soit crucial pour le développement surrénalien (87).

Dans la surrénale, son expression débute dans la crête urogénitale à e9-9.5. Les souris *Sf1*^{-/-}, dans lesquelles le gène *Sf1* est complètement inactivé, sont caractérisées par une absence totale de gonades et de glandes surrénales, et meurent autour du 8^e jour post-natal d'insuffisance surrénalienne. Leur primordium adrénogonadique initial se développe, mais il régresse par apoptose entre e11.5 et e12.5 (75). Les souris *Sf1*^{+/-} présentent une hypoplasie adrénocorticale visible dès e13.5 avec une médulla hypoplasique et désorganisée. Chez les souris *Sf1*^{+/-} adultes, il y a une hypertrophie évidente des cellules adrénocorticales et la stéroïdogénèse est légèrement altérée avec une réponse au stress moins efficace (88). Leurs gonades ont par contre une apparence normale. Ces résultats démontrent que : 1) SF1 est essentiel au développement précoce et au maintien des surrénales et des gonades d'une manière proportionnelle à son niveau d'expression. En effet, dans une étude réalisée par le groupe de Val en 2007, la sévérité du phénotype surrénalien était corrélée au degré de perte d'expression de *Sf1* dans le PAG à e10.5 (80). 2) L'expression de *Sf1* dans le cortex est également cruciale pour l'organisation et la croissance de la médulla, suggérant que SF1 régule des gènes impliqués dans les interactions cortico-médullaires durant l'organogenèse. 3) Les gonades sont moins sensibles à une diminution d'expression de *Sf1* dans les modèles transgéniques étudiés (88-90).

La régulation précise de l'expression de *Sf1* est primordiale durant l'organogenèse. Son expression doit atteindre un niveau seuil critique dans le PAG pour permettre la différenciation adéquate du primordium adénocortical. À ce moment, le co-facteur transcriptionnel *CBP/p300 interacting transactivator with ED-rich tail 2* (CITED2) interagit avec *Wilms tumor 1* (WT1) dans le PAG au niveau des séquences régulatrices en 5' de *Sf1* pour augmenter l'expression de *Sf1* au-delà de ce seuil. Il est intéressant de noter que les souris *Cited2*^{-/-} n'ont pas de surrénale à e17.5 et que l'expression de *Sf1* dans leur PAG est drastiquement diminuée, mais leurs gonades sont d'apparence normale (80, 91, 92).

En 2006, le groupe de Zubair a identifié un amplificateur appelé *fetal adrenal-specific enhancer* (FADE) dans le quatrième intron de *Sf1* qui est un médiateur critique de l'expression de *Sf1* dès e10.5 dans le primordium adrénocortical chez la souris (10). FADE contient des sites de liaison pour différents facteurs de transcription, soit *Pre B cell leukemia homeobox 1/Pbx/knotted 1 homeobox 1* (PBX/PREP) et *PBX/Homeobox* (PBX/HOX), qui sont essentiels pour initier la transcription de *Sf1*. Par la suite, la protéine SF1 se lie elle-même à FADE pour maintenir sa propre transcription via une boucle d'auto-régulation (10).

FAdE n'est plus utilisé à partir de e14.5 et il semble y avoir un amplificateur différent de *Sf1* dans la surrénale adulte qui n'a pas encore été découvert (10).

Plusieurs autres éléments sont impliqués dans la régulation du niveau d'expression de SF1 dans le développement embryonnaire de la surrénale. Le *Transcription factor 21* (TCF21) ou POD1 est un facteur de transcription exprimé dès e9.5 qui sert à restreindre l'expression de *Sf1*. Son absence empêche la séparation physique du PAG (93). Le facteur *Dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome* (DAX1) ou *Nuclear Receptor Subfamily O Group B Member 1* (NROB1), qui appartient à la famille des récepteurs nucléaires, régule aussi le niveau d'expression de SF1. Il agit comme répresseur de la transcription de *Sf1* en diminuant l'activité de FAdE (79) et il inhibe également la transcription des gènes stéroïdiens médiée par SF1 (94). Zubair et ses collaborateurs ont observé que DAX1 était plus fortement exprimé dans le primordium gonadique, ce qui inactive FAdE, tandis que la plus faible expression dans le primordium adrénocortical maintient l'activité de FAdE. En se basant sur ces résultats, ils ont spéculé que DAX1 empêche la différenciation adrénocorticale des cellules du PAG dédiées à un destin gonadique (79, 95). Plus récemment, un nouveau rôle de DAX1 a été découvert grâce à des souris *Dax1*^{-/-} (inactivation de *Dax1*, situé sur le chromosome X); il a été démontré que DAX1 joue un rôle essentiel dans le maintien de la pluripotence des cellules progénitrices adrénocorticales. En effet, la déficience en DAX1 cause une différenciation excessive des progéniteurs sous-capsulaires, épuisant éventuellement cette population cellulaire, et menant à l'insuffisance surrénalienne (96).

1.3.2.2 *Wilms' tumor suppressor gene 1 (WT1)*

Plusieurs études de perte de fonction ont établi que WT1 était essentiel au développement adrénogonadique ainsi que de plusieurs autres organes (97). Le gène *Wt1* code pour un régulateur transcriptionnel; il tire son nom du fait qu'il est muté dans un nombre significatif (10-15%) de tumeurs rénales pédiatriques appelées tumeur de Wilm. Jusqu'à 26 isoformes différentes peuvent être générées via des mécanismes pré et post-transcriptionnels. Par exemple, l'épissage alternatif à la jonction des exons 9 et 10 génère des isoformes avec ou sans la présence de trois acides aminés (WT1+KTS ou WT1-KTS respectivement). Ces isoformes possèdent différentes fonctions biologiques en lien entre autres avec leur affinité pour l'ADN et leur localisation cellulaire (98). *Wt1* est exprimé dans le PAG et dans les gonades indifférenciées, mais pas dans les cellules adrénocorticales après leur séparation du PAG (99).

Durant le développement adrénocortical, l'expression de WT1 est aperçue en premier au jour e9.5 dans la crête urogénitale, accompagnée de GATA4, qui est considéré un marqueur du PAG. Les premières cellules SF1+ apparaissent au jour e9.75 (WT1+/GATA4+/SF1+), suivies de la chute rapide de l'expression

de WT1 et de GATA4. Au jour e11.5, WT1 n'est plus détectable dans les cellules SF1+ mais il demeure exprimé dans quelques cellules de la capsule. Il est à noter que de rares cellules WT1+/GATA4+ persistent dans le cortex durant le développement. Parallèlement, des cellules des gonades en développement continuent de co-exprimer WT1 et SF1. Les souris déficientes en *Wt1* n'avaient pas de reins, de gonades ni de surrénales, mais on pouvait apercevoir un épaississement de la crête urogénitale (100).

Afin de déterminer le rôle de cette répression de WT1 dans le développement adrénocortical, Bandiera et al. (2013) ont utilisé un modèle de souris permettant d'exprimer différentes isoformes de *Wt1* dans les cellules stéroïdogéniques à partir de e12.5 (croisements de souris *Rosa26:Wt1+KTS* et *Rosa26:Wt1-KTS* avec *Sf1-Cre*). Les surrénales des embryons homozygotes *Rosa26^{Wt1+KTS/Wt1+KTS};Sf1-Cre* sont normales tandis que celles des *Rosa26^{Wt1-KTS/Wt1-KTS};Sf1-Cre* sont moins volumineuses, avec une morphologie cellulaire altérée. Dans ce même modèle, l'activation de l'isoforme WT1-KTS, mais pas de WT1+KTS, a maintenu l'expression de GATA4 et a empêché la différenciation stéroïdogénique en régulant directement les gènes cibles *Glioma-associated oncogen (Gli1)* et *Tcf21* dans les cellules adrénocorticales SF1+ dès le jour e12.5. TCF21 peut se lier au promoteur de SF1 pour restreindre son expression (101, 102). Ces résultats démontrent que la répression de WT1-KTS est essentielle à la différenciation des cellules du PAG en cellules adrénocorticales stéroïdogéniques. WT1 joue donc deux rôles dans le développement adrénocortical : 1) il active *Sf1* au niveau du PAG, conférant un destin stéroïdogénique aux cellules comme expliqué précédemment et 2) il restreint l'expression de *Sf1* via l'activation de *Tcf21* dans certaines cellules de la capsule, pour maintenir une population qui n'est pas différenciée en cellules stéroïdogéniques (98).

Des expériences de traçage avec le modèle *Wt1:Cre-GFP;mTmG* (103), qui marque les cellules qui expriment WT1 et ses descendants de manière irréversible en activant la protéine verte fluorescente (GFP), ont permis de démontrer que la totalité des cellules SF1+ provient de cellules WT1+ du PAG. De plus, une grande proportion des cellules mésenchymateuses de la capsule dérive de cellules WT1+ (98).

Il y a de rares cellules adrénocorticales WT1+ qui persistent durant la vie adulte et qui représentent une population de progéniteurs capables de se différencier en cellules stéroïdogéniques SF1+. Des expériences de traçage ont démontré que la contribution de ces progéniteurs au maintien du cortex adulte semble négligeable en situation physiologique (98). Dans la surrénale, la gonadectomie stimule la prolifération des cellules fusiformes sous-capsulaires (cellules A), normalement quiescentes, et leur différenciation en *gonadal-like cells* (cellules B) capables de synthétiser des hormones sexuelles (104, 105), probablement en réponse à la LH (106-108). Ces cellules expriment CYP17 et le récepteur de la LH. Dans

les souris *Wt1:Cre-GFP;mTmG* gonadectomisées, les cellules qui exprimaient WT1+ ont perdu l'expression de WT1 et expriment fortement SF1 et GATA4, indiquant que les cellules WT1+ peuvent se différencier en cellules B apparentées aux cellules des gonades. En conclusion, les cellules WT1+ représentent une population de cellules progénitrices ayant conservé des propriétés du PAG et qui sont capables de se commettre à la lignée gonadique ou adrénérergique (98).

1.3.2.3 Voie *Wnt*/ β -caténine dans le développement précoce

La voie de signalisation *Wnt* est impliquée dans le développement embryonnaire de plusieurs organes. Plus particulièrement, *Wnt4* est essentiel au développement normal du cortex surrénalien, des reins (109), de l'hypophyse (110), du canal de Müller (111) et des ovaires (112). Les souris déficientes en *Wnt4* meurent d'insuffisance rénale à un jour d'âge.

La quantité de β -caténine cytoplasmique est régulée par un complexe de destruction composé de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3), de la sérine/thréonine caséine kinase 1 (CK1), de la protéine *Adenomatous polyposis coli* (APC), de l'Axin et du gène tumoral de Wilm sur le chromosome X (WTX). L'activation de la voie canonique *Wnt* résulte en l'accumulation cytoplasmique et nucléaire de la β -caténine (113). Plus concrètement, les ligands WNT se lient au récepteur *Frizzled* et au co-récepteur LRP5/6, ce qui mène à la phosphorylation de la région intra-cellulaire de LRP5/6 par GSK3 β et CK1 γ . La protéine Axin est recrutée à la membrane cytoplasmique et interagit avec LRP5/6 phosphorylé, ce qui empêche la destruction de la β -caténine, qui s'accumule alors dans le cytoplasme, une étape qui dépend de *Dishevelled* (Dvl). La β -caténine transloque alors au noyau, où elle agit comme co-activateur transcriptionnel en interagissant avec les membres de la famille *T-cell factor/lymphoid enhancer factor* (TCF/LEF) (4, 114-116) pour induire l'expression des gènes cibles. Dans la surrénale, la protéine *R-spondin 3* (RSPO3) est un ligand particulier qui envoie un signal des cellules mésenchymateuses de la capsule vers les cellules sous-capsulaires afin d'activer la voie *Wnt*/ β -caténine pour maintenir la zonation (117). En absence de ligand WNT, la β -caténine cytoplasmique est phosphorylée par la GSK3 dans le complexe de destruction suivi de son ubiquitination par la *ligase E3 β -transducin repeat-containing protein* (β -TrCP) et sa dégradation protéasomale subséquente. Ceci diminue la transcription des gènes cibles (Figure 5).

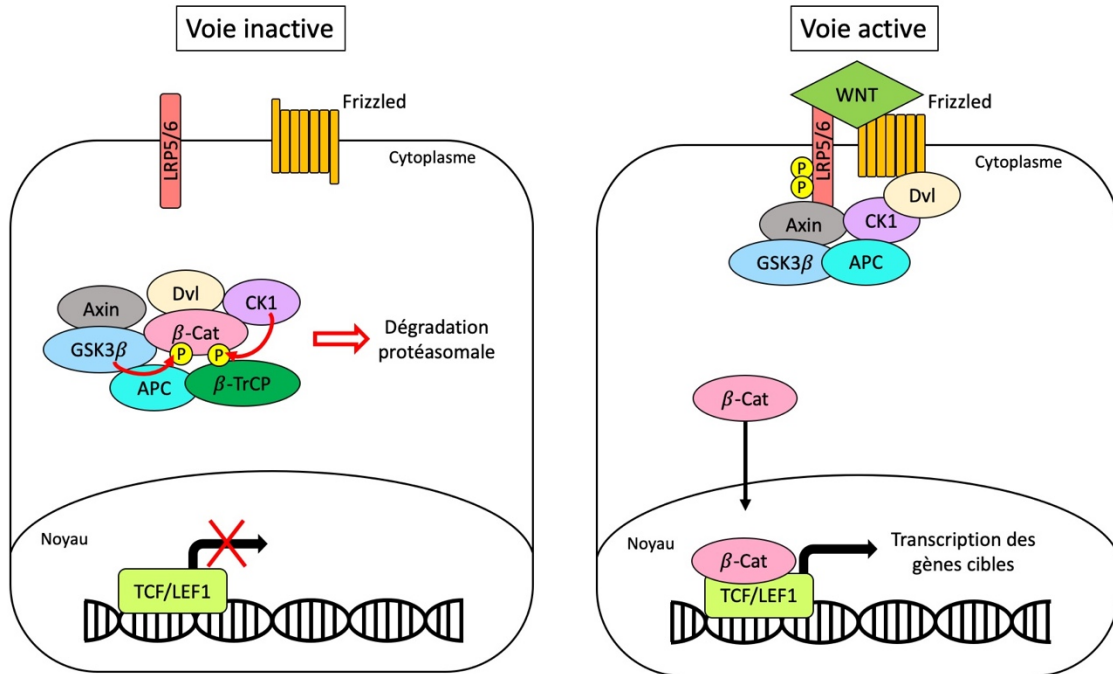


Figure 5. Voie de signalisation canonique Wnt/ β -caténine

Schéma simplifié de la voie de signalisation canonique Wnt/ β -caténine inactive à gauche et active à droite. Modifié de Kim, 2014 (118).

La β -caténine est requise pour stimuler et pour maintenir la prolifération des cellules adrénocorticales durant le développement. En effet, l'inactivation complète de la β -caténine chez des souris *Sf1/Cre^{High}* a drastiquement diminué la prolifération du cortex, avec une disparition presque complète du cortex et de la médulla vers e18.5. L'inactivation partielle de la β -caténine (souris *Sf1/Cre^{Low}*) a causé un amincissement et une désorganisation du cortex à 45 semaines d'âge avec une diminution des marqueurs stéroïdiens, indiquant que la β -caténine est aussi importante pour le renouvellement des cellules corticales durant la vie adulte (115).

Six ligands WNT ont été identifiés dans la surrénale murine; WNT4, 5a, 5b, 2b, 9a et 11 sont exprimés chez le fœtus tandis que seul WNT4 est exprimé chez l'adulte. Une étude d'hybridation *in situ* a démontré que, durant la vie fœtale, WNT4 est exprimé dans une région circulaire près du pôle antérieur du mésonéphros au jour e11.5 avec un patron similaire à SF1, correspondant à l'ébauche du cortex surrénalien. Par la suite, WNT4 est exprimé dans la région plus externe du cortex surrénalien, chevauchant l'expression de CYP11B2 et PREF-1 (ou DLK1). Bien que les surrénales des souris déficientes en *Wnt4* ont une morphologie normale à la naissance, l'expression de CYP11B2 est diminuée (119) au premier jour de vie, ce qui suggère que la zG ne se développe pas normalement sans *Wnt4*. À cet âge, l'aldostérone

circulante était significativement plus basse chez les mutants. Dans les embryons *Wnt4*^{-/-}, des cellules CYP21-positives (un marqueur adrénocortical) ont été aperçues dans les gonades mâles et femelles, suggérant que certaines cellules d'origine adrénérique auraient migré vers les gonades lors du développement précoce (e11). *Wnt4* est donc impliqué dans la séparation des précurseurs des cellules gonadiques et adrénériques, ou empêche la migration de cellules adrénériques vers les gonades (119).

1.3.3 Transition du cortex fœtal au cortex adulte et origine de la capsule

Au moment où la glande surrénale émerge crânialement au rein, le cortex contient deux populations cellulaires distinctes : le cortex fœtal (zone interne, plus grandes cellules) et le cortex adulte ou définitif (zone externe, petites cellules denses) (79). Le nombre de cellules du cortex adulte augmente graduellement alors que les cellules du cortex fœtal s'accumulent à la jonction cortico-médullaire. Avec leurs analyses de traçage, le groupe de Morohashi a proposé en 2008 que le cortex adulte dérive du cortex fœtal (cellules dans lequel le promoteur FAdE est actif). La capacité de ces cellules de servir de précurseurs au cortex adulte est perdue à partir de e14.5. Dans leurs expériences, DAX1 était plus fortement exprimé dans le cortex adulte, donc ils ont suggéré que DAX1 régulaait cette transition des cellules fœtales à adultes (79). Ceci est compatible avec la persistance de la zone X chez les souris déficientes en *Dax1* (120).

Histologiquement, la formation de la capsule a été décrite comme la coalescence de cellules mésenchymateuses du mésoderme intermédiaire. Des analyses génétiques plus poussées ont permis de mieux caractériser les populations cellulaires qui composent la capsule. En fait, une proportion significative des cellules dérive effectivement de la condensation de cellules mésenchymateuses adjacentes durant le développement surrénalien et elles expriment WT1. Certaines de ces cellules expriment GLI+ et d'autres non (98). Il y a une autre sous-population qui origine des cellules adrénocorticales fœtales SF1+ qui se différencient en cellules mésenchymateuses capsulaires. Ces cellules sont GLI1+ et SF1-. Elles servent de progéniteurs pour les cellules adrénocorticales adultes (cortex définitif). Nous ignorons si les cellules adrénocorticales adultes peuvent prendre directement origine des cellules fœtales. En d'autres mots, certaines cellules capsulaires GLI+ dérivent du mésenchyme adjacent (GLI+/WT1+) et d'autres des cellules du cortex fœtal (GLI+/WT1-) (98, 121). Finalement, il y a une population de cellules mésenchymateuses dans la capsule exprimant *Tcf21* qui donnent naissance aux cellules stromales du cortex surrénalien, mais pas aux cellules stéroïdogéniques. Ces populations cellulaires capsulaires perdurent dans la vie adulte et sont importantes pour l'homéostasie (121).

La manière dont les cellules capsulaires s'engagent dans le cortex pour son maintien n'est pas encore complètement élucidée, mais plusieurs acteurs sont importants tels que WNT4, *insulin-like growth factor 2* (IGF2), DLK1 ou PEF-1, DAX1, β -caténine, le récepteur aux glucocorticoïdes, etc. (122)

1.3.4 Développement du cortex définitif

Comme expliqué plus tôt, le cortex définitif commence à être formé dans la deuxième moitié de la gestation et est renouvelé durant toute la vie post-natale. Plusieurs voies de signalisation permettent de réguler méticuleusement le développement et l'homéostasie de ce tissu endocrinien.

1.3.4.1 *Sonic hedgehog*

Sonic hedgehog (SHH) fait partie d'une famille de protéines jouant un rôle important dans le développement embryonnaire, l'homéostasie et le cancer chez les mammifères (123-126). Les protéines de la famille Hedgehog (HH) sont des molécules sécrétées qui agissent sur leurs cellules cibles en se liant à des récepteurs comme *Patched1* (PTCH1; récepteur transmembranaire à 12 passages), *cell-adhesion-molecule-related/downregulated by oncogenes* (CDO), *brother of Cdo* (BOC) ou GAS1 (127, 128). En l'absence de HH, PTCH1 est localisé à la base du cil primaire, où il exclut la protéine transmembranaire Smoothened (SMO). Les facteurs de transcription GLI2 et GLI3, qui peuvent avoir une activité activatrice ou inhibitrice et qui sont également localisés dans le cil primaire, sont alors dégradés et clivés pour produire leur forme inhibitrice. Ceci résulte en diminution de la transcription des gènes cibles de HH. À l'inverse, l'inhibition de PTCH1 via la liaison d'une protéine HH mène à la dé-répression de SMO et son accumulation dans le cil primaire. Ceci inhibe la protéolyse de GLI2/3 et donc active la transcription des gènes cibles. *Gli1* est un gène cible direct de la signalisation HH et agit comme transactivateur transcriptionnel en augmentant la transcription des gènes cibles de HH (129, 130) (Figure 6).

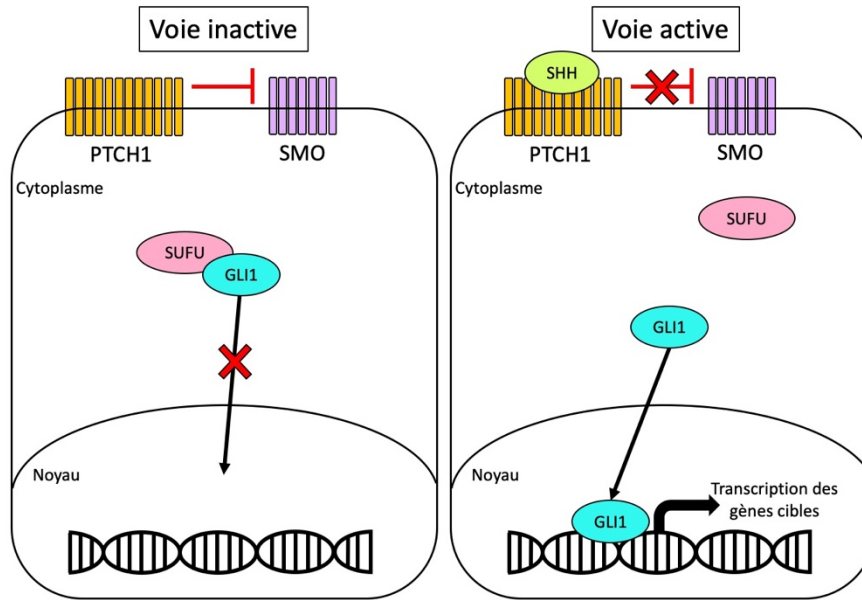


Figure 6. Voie de signalisation SHH simplifiée

SUFU : *Suppressor of Fused*. Modifié de Rimkus, 2016 (131)

Dans la surrénale, l'expression de *Shh* est détectée dans des agrégats de cellules sous la capsule durant l'embryogenèse et la vie post-natale. Les premières cellules SHH-positives sont visibles dans le primordium adrénocortical à e11.5, après la séparation du PAG, et sont indépendantes de la signalisation *Shh* (82). Une deuxième population de cellules SHH+ descendent des cellules GLI1+ et répondent à la signalisation *Shh*. La majorité des cellules SHH+ exprime des marqueurs stéroïdogéniques comme SF1 et la biotine endogène (132), mais n'exprime pas CYP11B2 ni CYP11B1 malgré leur localisation dans la zG (82). Ce sont donc des cellules de la lignée stéroïdogénique partiellement différenciées qui ne possèdent pas les enzymes nécessaires à la synthèse hormonale. Des analyses de lignée ont démontré que les cellules SHH+ peuvent se différencier en tous les types de cellules stéroïdogéniques (CYP11B1+ ou CYP11B2+) et migrer centripètement dans toutes les zones corticales (zG et zF), mais pas dans la capsule ni la médulla, donc *Shh* marque une population de cellules progénitrices corticales (132). Les cellules SHH+ n'ont pas une capacité de prolifération supérieure aux autres cellules adrénocorticales, mais elles peuvent s'auto-renouveler de manière illimitée pour maintenir une réserve de progéniteurs (4, 17).

Dans un modèle de souris qui ont une délétion conditionnelle de *Smo* dans la lignée stéroïdogénique (*Sf1-cre;Smo^{Co/Co}*) (133), il n'y avait pas d'anomalie en lien avec la taille de la glande, la différenciation des cellules stéroïdogéniques et la zonation. Ce résultat confirme que les cellules stéroïdogéniques ne répondent pas significativement à la signalisation *Shh* (82). La délétion conditionnelle

d'un allèle *Shh* dans les cellules stéroïdogéniques (*SF1-cre;Shh^{co/-}*) a engendré une hypoplasie corticale évidente dès e13.5 avec une diminution de la prolifération cellulaire et un amincissement de la capsule. La zonation et la différenciation étaient normales. De plus, la médulla était de taille normale et bien différenciée, mais souvent ectopique (excentrique, en îlots ou sur la capsule) (82, 134, 135). En conclusion, la voie de signalisation *Shh* est essentielle pour la croissance du cortex surrénalien, mais pas pour la différenciation ni la zonation (82).

Comme expliqué plus tôt, il y a des cellules GLI+ dans la capsule (130) qui expriment fortement le récepteur PTCH1 (136) et répondent à la signalisation *Shh*. Des analyses de lignage ont démontré que les descendants des cellules capsulaires GLI+ se trouvent dans le cortex et expriment alors SF1 et SCC. Ces résultats suggèrent que les cellules mésenchymateuses capsulaires GLI1+SF1- peuvent acquérir une identité stéroïdogénique GLI1-SF1+ pour contribuer à tout le cortex, incluant la population de progéniteurs SHH+ (82, 135).

1.3.4.2 Fibroblast growth factors (FGFs)

Les *Fibroblast Growth Factors* sont impliqués dans le développement de plusieurs tissus, dont la surrénale (137). Il existe quatre récepteurs (FGFR1-4), qui sont des tyrosine kinases transmembranaires contenant trois domaines immunoglobulines extracellulaires. L'épissage alternatif des récepteurs FGFR1-3 forme des isoformes IIIb ou IIIc. Le récepteur FGFR2F IIIb peut être activé par 5 ligands : FGF 1, 3, 7, 10 et 22 (138), mais seulement FGF1 a été détecté dans le cortex. L'isoforme FGFR2 IIIc est aussi exprimé dans le cortex et est activé par FGF 2 et 9 (139), qui ont été détectés dans la capsule. En culture cellulaire, FGF2 a un effet mitogène sur les cellules adrénocorticales (140). Une signalisation entre la capsule et le cortex est donc possible via les FGFs, mais l'importance relative de cette signalisation dans le développement et le maintien du cortex reste à élucider.

Guasti et *al.* (2013) ont tenté de mieux comprendre le rôle de FGFR2 dans le développement adrénocortical avec des souris transgéniques. Ils ont montré que chez l'embryon et l'adulte, les isoformes de FGFR2F IIIb/c sont exprimées sous la capsule dans des cellules CYP11B1-négatives dans un patron similaire à SHH et β -caténine (82, 141). Les souris *Fgfr2 IIIb null* meurent à la naissance, donc les embryons ont été étudiés à e15.5. Ils présentaient une hypoplasie surrénalienne associée à une diminution de la prolifération cellulaire corticale. La capsule était sévèrement épaissie, vraisemblablement à cause d'une augmentation de la prolifération capsulaire. Dans le cortex, l'expression de marqueurs stéroïdiens était diminuée. Puisque la glande était formée, la signalisation via FGFR2 n'est pas essentielle à la formation du

primordium adrénocortical, mais est requise pour la croissance subséquente de la glande (115, 141). Ce même groupe a également investigué l'interaction entre la signalisation des FGF avec d'autres voies. Dans la capsule des embryons *Fgfr2 IIIb null*, l'expression de *Gli1* était augmentée. Ceci pourrait indiquer que le rôle de la signalisation FGF via FGFR2 IIIb est de restreindre l'activité de la voie *Shh* (141).

Enfin, l'expression du *preadipocyte factor-1* (*Pref-1* ou *Dlk1*), normalement exprimé dans la capsule chez les souris, avait complètement disparu chez les mutants. Ce résultat est très intéressant; dans une étude d'énucléation de la surrénale de rats, l'expression de *Pref-1* chutait, et il a été suggéré que *Pref-1* régulait négativement la différenciation adrénocorticale (6) L'énucléation est un modèle qui consiste à enlever la masse interne de la surrénale pour que le cortex se régénère à partir de la capsule et des cellules sous-capsulaires adhérentes. Guasti *et al.* (2013) ont suggéré que *Pref-1* pourrait inhiber la différenciation des cellules souches GLI+ de la capsule, ce qui expliquerait le phénotype capsulaire observé dans leur étude (141).

1.3.4.3 GATA Binding Protein 4 et 6

Les facteurs de transcription *GATA Binding Protein* (GATA1 à GATA6) jouent un rôle partiellement redondant dans le développement de plusieurs tissus (142, 143). Dans la glande surrénale, il a été démontré que la délétion simultanée de GATA4 et GATA6 dans les cellules précurseurs adrénocorticales entraînait une perte de l'expression de SF1, une diminution de la prolifération cellulaire et l'agénésie de la glande chez les deux sexes. Les femelles décédaient d'insuffisance surrénalienne en bas âge, mais les mâles avaient une durée de vie normale, probablement grâce à la synthèse compensatoire d'hormones stéroïdiennes dans les testicules. En effet, un nombre supérieur de cellules *adrenal-like* étaient observées au niveau du testicule (144). Ces cellules, normalement présentes en petites quantités dans les testicules, exprimaient des enzymes adrénocorticales et synthétisaient des glucocorticoïdes (144, 145). La délétion de GATA6 uniquement entraîne une hypoplasie surrénalienne alors que les surrénales des animaux ayant une délétion de GATA4 semblaient phénotypiquement normales. En résumé, GATA6 est crucial pour la différenciation et le maintien des cellules adrénocorticales et GATA4 y est dispensable, mais serait malgré tout impliqué dans la formation de la glande surrénale (144).

1.3.5 Maintien post-natal et zonation du cortex surrénalien

La surrénale est un organe dynamique qui est continuellement renouvelé afin de répondre aux besoins de l'organisme dans un contexte physiologique ou pathologique. Plusieurs études de traçage ont permis de mieux comprendre comment le cortex surrénalien définitif se développe et se renouvelle durant

la vie post-natale, ce qui a mené à l'élaboration du modèle de migration centripète. D'après ce modèle, des cellules progénitrices sont recrutées en continu à partir des réservoirs capsulaires ou sous-capsulaires via la signalisation *Shh/Gli1* (82, 146). Elles migrent vers l'intérieur de la glande, en se différenciant d'abord en cellules de la zG. En continuant leur migration, elles atteignent éventuellement la zF, où elles se différencient sous l'influence de plusieurs signaux, avant de mourir par apoptose à la jonction cortico-médullaire (146). Les prochaines sections expliqueront les mécanismes moléculaires à la base de ces différenciations successives.

1.3.5.1 Zonation de la zG : voie Wnt/ β -caténine

Dans la zG, la voie Wnt/ β -caténine régule la prolifération cellulaire et est un acteur important dans l'établissement de l'identité des cellules de la zG (114, 147). Dans l'étude de Vidal datant de 2016, l'inhibition de la signalisation Wnt (délétion de *Rspo3*) a réduit la prolifération des cellules de la zG (117). Dans une autre étude, l'activation constitutive de la β -caténine chez des souris transgéniques a stimulé la prolifération de la zG et a même entraîné la présence de cellules de la zG ectopiques dans la zF (114). De même, une activation soutenue de la voie Wnt/ β -caténine a été identifiée dans 70% des adénomes produisant de l'aldostérone (148). Ce phénomène pourrait être dû au fait que la signalisation Wnt/ β -caténine supprime l'activité de la zF. Ceci a été démontré entre autres avec une culture d'une lignée de cellules murines *zF-like* (ATC7-L), dans laquelle l'activation de la signalisation Wnt a réduit l'expression de *Cyp11b1* et du récepteur de l'ACTH *Mc2r*, propres à la zF (4).

La prolifération des cellules de la zG peut être enclenchée par plusieurs stimuli, dont l'angiotensine II, un faible apport en sodium ou un apport élevé en potassium (149-153). La voie Wnt/ β -caténine est aussi importante pour réguler la synthèse d'aldostérone. Dans des cultures cellulaires humaines, il a été démontré que la β -caténine pouvait amplifier l'expression du récepteur à l'angiotensine II (AT1R) et indirectement stimuler l'expression de l'enzyme CYP11B2 en régulant la transcription des récepteurs nucléaires orphelins NUR77 et NURR1 (148). Similairement, l'activation constitutive de la β -caténine ou l'inactivation de l'APC ont toutes les deux mené à de l'hyperaldostéronisme chez des souris transgéniques (114, 154). À l'inverse, les modèles de délétion de β -caténine ou de *Wnt4* ont engendré une diminution de l'expression de CYP11B2 et de la production d'aldostérone (115, 119).

Plus récemment, un nouvel acteur important a été identifié dans le maintien du gradient de la signalisation Wnt dans le cortex : le *Zinc and ring finger 3* (ZNR3). Rappelons que ce gradient est crucial pour la zonation et pour l'identité et la fonction des cellules adrénocorticales. ZNR3 est une ubiquitine ligase E3 transmembranaire qui agit comme régulateur négatif de la signalisation Wnt (155) en induisant

l'endocytose des récepteurs *Frizzled*. ZNRF3 est lui-même régulé par la protéine sécrétée RSPO, qui élimine ZNRF3 de la membrane cytoplasmique (156). Dans des souris transgéniques, la perte de ZNRF3 dans les cellules adrénocorticales a entraîné une hyperplasie du cortex associée à une expansion de la zF. Le gradient Wnt était altéré, avec une activation modérée de la signalisation Wnt dans le cortex interne (157). Chose surprenante, ce phénotype est différent du modèle de gain de fonction de la β -caténine (activation importante), dans lequel c'est la zG qui prend de l'expansion (114), confirmant que le niveau d'activité Wnt/ β -caténine influence le destin cellulaire. Dans la même étude, un modèle de double *knockout* de *Znrf3* et de *porcupine* (PORCN), une enzyme requise pour la sécrétion des ligands WNT (158), a partiellement rétabli le phénotype, ce qui indique que la fonction de ZNRF3 dépend fortement de la signalisation Wnt. En somme, ZNRF3 est un important médiateur du gradient de la signalisation Wnt dans le cortex et donc de l'homéostasie du cortex surrénalien.

1.3.5.2 Zonation de la zF : Voie ACTH/AMPC/PKA

Dans la zF, la différenciation des cellules ainsi que la régulation de la stéroïdogénèse et de la prolifération cellulaire sont sous le contrôle de la voie ACTH/AMPC (adénosine monophosphate cyclique), qui est principalement active dans cette zone. Cette cascade de signalisation débute avec la liaison de l'ACTH à son récepteur mélanocortine 2 couplé aux protéines G (MC2R) qui interagit avec la protéine MC2R accessoire (MRAP) (159-161). Cette liaison entraîne la relâche de la sous-unité alpha de la protéine stimuloire G (*Alpha subunit of the stimulatory G protein*) et la conversion de l'ATP en AMPC par l'adénylyl-cyclase (162, 163), menant à l'activation de l'*AMPC-dependent protein kinase* (PKA) et la phosphorylation subséquente de cibles cytoplasmiques ou nucléaires comme les facteurs de transcription *cAMP-responsive element modulator* (CREM) et *cAMO-responsive element binding protein* (CREB) (164). Les enzymes CYP11B1 et AKR1B7, exclusivement exprimées dans la zF, sont des cibles de la voie ACTH/AMPC (9, 146)

Plusieurs expériences ont démontré que la signalisation ACTH/AMPC régule la prolifération cellulaire de la zF. Par exemple, les humains avec une mutation des gènes codant pour le récepteur MC2R et pour MRAP présentent une zF hypoplasique avec une zG morphologiquement intacte (165). Des souris transgéniques avec une délétion du précurseur de l'ACTH, la proopiomélanocortine (POMC), avaient elles aussi une diminution de prolifération cellulaire et une hypoplasie sévère de la zF (166). Des résultats similaires ont été obtenus chez des souris adultes lors de la suppression de la production d'ACTH avec la dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique (146).

La signalisation ACTH/AMPC joue aussi un rôle primordial dans la zonation structurelle et fonctionnelle de la zF et son maintien. Dans une étude réalisée par le groupe de Martinez en 2010, une délétion du gène *Prkar1a* codant pour la sous-unité régulatrice 1 α de PKA (R1 α) dans le cortex surrénalien a permis d'obtenir un modèle de souris avec une activation constitutive de la signalisation AMPC. Ces souris ont développé un syndrome de Cushing indépendant de l'hypophyse, une dérégulation de la différenciation adrénocorticale et une hyperplasie surrénalienne. Ce modèle avait aussi des défauts de zonation, avec l'apparition d'une nouvelle population cellulaire d'origine incertaine exprimant des marqueurs de la zF et de la zone X (167).

1.3.5.3 Antagonisme entre la voie Wnt/ β -caténine et la voie ACTH/AMPC

Comme expliqué précédemment, la zonation du cortex et son renouvellement durant la vie post-natale repose sur le recrutement de progéniteurs sous-capsulaires et leur différenciation subséquente en cellules de la zG puis de la zF. Plusieurs études récentes ont prouvé que ce changement d'identité cellulaire au cours de la migration repose sur l'antagonisme entre la signalisation Wnt/ β -caténine et ACTH/AMPC. Voici le modèle le plus accepté actuellement :

Tout d'abord, l'identité des cellules de la zG est établie grâce à l'activation de la voie Wnt/ β -caténine, qui induit l'expression du récepteur de l'angiotensine II (AT1R) et de l'enzyme CYP11B2 (148) et inhibe la différenciation en cellules de la zF via la répression de l'expression du récepteur de l'ACTH (MC2R) et de CYP11B1 (4, 114, 147, 148).

En continuant leur migration centripète, les cellules de la zG se rapprochent de la zF et échappent progressivement à l'influence de la signalisation Wnt. Ceci réduit alors l'inhibition de l'expression de MC2R (4), permettant l'activation de la signalisation PKA par la liaison de l'ACTH à MC2R. La voie ACTH/AMPC vient alors inhiber définitivement la signalisation Wnt, permettant aux cellules de la zG de se différencier en zF. La différenciation zG-zF se fait donc progressivement plutôt qu'abruptement (147). Des cellules exprimant à la fois CYP11B1 et CYP11B2 ont été observées à la jonction zF-zG, ce qui concorde avec cette hypothèse (146).

1.3.5.4 Intégration des différentes voies dans l'homéostasie du cortex

Le renouvellement du cortex est un processus complexe qui implique plusieurs des voies de signalisation. Un bref résumé de notre compréhension actuelle de l'interaction entre les voies sera présenté.

Chez l'adulte, en situation physiologique, ce sont les cellules progénitrices sous-capsulaires SHH+/SF1+ qui donnent naissance aux cellules CYP11B2+ différenciées de la zG, qui se différencient par la suite en cellules CYP11B1+ de la zF (82, 146). La signalisation Shh active GLI1 dans les cellules souches mésenchymateuses GLI1+ de la capsule. Ces cellules vont être recrutées pour donner naissance à toutes les cellules corticales SF1+, incluant les cellules progénitrices SHH+. Le recrutement des cellules GLI1+ joue un rôle important durant le développement pour former le cortex, mais leur contribution au renouvellement de la lignée corticale est grandement diminuée chez l'adulte (82, 135) (Figure 7).

Des expériences de traçage ont été réalisées avec un modèle d'atrophie de la zF induite par l'administration de dexaméthasone chez des souris par le groupe de Hammer en 2018 afin d'étudier plus en profondeur les mécanismes impliqués dans la régénération corticale après un dommage, plus particulièrement les interactions entre la signalisation Wnt et Shh. Ces souris étaient modifiées génétiquement de manière à exprimer des gènes rapporteurs sous le contrôle des promoteurs inductibles de *Gli* et *Shh*. Les résultats ont permis de conclure qu'après l'atrophie de la zF, les cellules capsulaires GLI1+ contribuent rapidement et transitoirement à la régénération (à court terme) tandis que les cellules corticales progénitrices SHH+ sont recrutées à plus long terme et apportent une contribution beaucoup plus significative (168) (Figure 7).

Dans la même étude, l'inhibition de *Gli1* dans la capsule par l'inhibiteur pharmacologique GANT61 a diminué l'activation de la voie Wnt dans le cortex, probablement à cause d'une diminution de la sécrétion de WNT4 et de RSPO3 dans la capsule (168). À l'inverse, l'activation constitutive de la signalisation Shh dans les cellules GLI1+ (modèle de souris *SmoM2*) a augmenté l'expression des gènes de la voie Wnt, causant une augmentation de la prolifération corticale et un regain plus rapide de la fonction de la zF après l'atrophie induite par la dexaméthasone. Ces résultats suggèrent que la signalisation paracrine Shh est nécessaire à la signalisation Wnt dans le cortex (168).

Pour résumer les conclusions de cette étude, les cellules progénitrices SHH+ répondant à la signalisation Wnt dans la zG produisent la protéine SHH, qui va activer la voie de signalisation Shh dans les cellules souches capsulaires GLI1+. En réponse à ce signal, les cellules GLI1+ vont se délaminer rapidement dans le cortex et se différencier en cellules stéroïdogéniques pour le renouvellement ou la régénération de la glande. De plus, l'activation de GLI1 va aussi augmenter l'expression des ligands WNTs (RSPO3 et WNT4) dans la capsule. RSPO3 va ensuite amplifier la signalisation Wnt et activer la β -caténine dans les cellules répondant à la voie Wnt, soit les cellules de la zG incluant les cellules Shh+. Ces dernières vont

repopuler la glande en se différenciant en cellules de la zG et en entamant la migration centripète (168) (Figure 7).

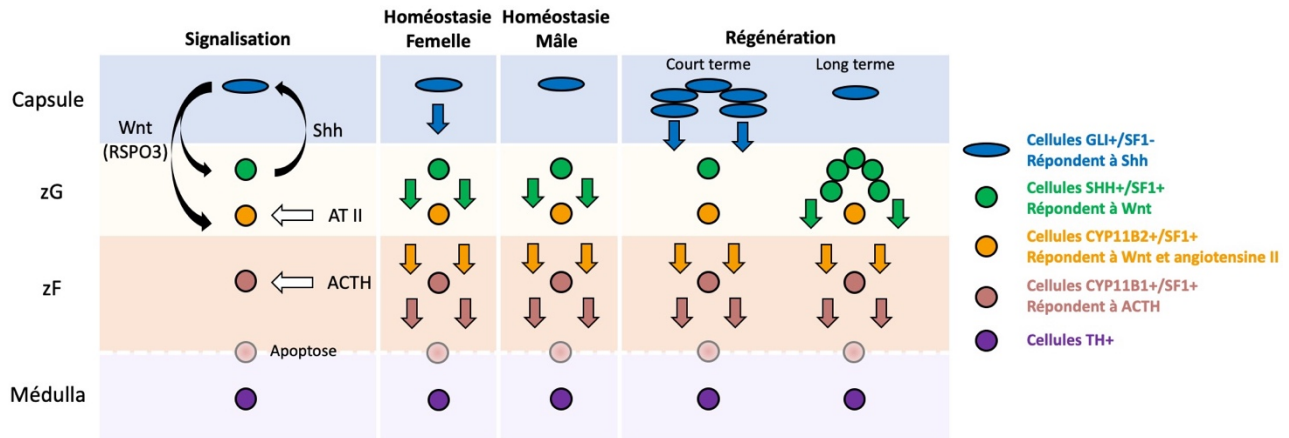


Figure 7. Maintien et régénération du cortex surrénalien chez la souris adulte

AT II : Angiotensine II. La ligne blanche pointillée représente la jonction cortico-médullaire. Les flèches noires et blanches représentent la signalisation paracrine et endocrine, respectivement. Les flèches bleues, vertes, oranges et roses représentent la migration des cellules vers le centre de la glande. Modifié de Finco 2018 (168).

1.3.5.5 Impact du sexe sur l'homéostasie du cortex

Récemment, le groupe de Schedl (2019) a étudié l'influence du genre sur le renouvellement du cortex surrénalien avec des analyses de traçage et des modèles d'inversion de sexe, de gonadectomie et de traitement à la dihydrotestostérone. Ils ont découvert des différences drastiques entre les femelles et les mâles. Chez la souris femelle, le cortex adulte est entièrement renouvelé en 3 mois tandis que ce processus nécessite plus de 6 mois chez les mâles (extrapolé à 9 mois). Chez ces derniers, seules les cellules progénitrices SHH+ participent au maintien du cortex. Chez les femelles, le recrutement et la prolifération de cellules souches mésenchymateuses capsulaires contribuent aussi au renouvellement, ce qui explique pourquoi le cortex est si rapidement remplacé par rapport aux mâles. Il a été démontré que ce sont les androgènes qui affectent négativement le recrutement de cellules souches capsulaires (169). De plus, les androgènes supportent l'activité WNT/ β -caténine, ce qui ralentit la différenciation des cellules de la zG en cellules de la zF chez le mâle et donc ralentit le renouvellement. La faible quantité d'androgènes retrouvée chez la femelle favorise plutôt la signalisation PKA et donc la différenciation en zF (170). L'inactivation conditionnelle du récepteur aux androgènes est suffisante pour abolir tout dimorphisme sexuel dans la surrénale (171), démontrant encore une fois l'importance des androgènes.

1.4 Autres effets du dimorphisme sexuel surrénalien

Il existe un dimorphisme sexuel important dans la surrénale tant au niveau phénotypique que fonctionnel chez les souris. En effet, les femelles ont des surrénales plus volumineuses que les mâles. Cette différence est principalement attribuable à la zF en raison de sa grande contribution au volume total de la surrénale (172, 173). Il y a également de profondes différences dans la dynamique d'apparition et de dégénérescence de la zone X chez les souris tel qu'expliqué plus tôt.

D'un point de vue fonctionnel, les concentrations plasmatiques d'ACTH, de corticostérone et d'aldostérone sont plus élevées chez les femelles (172, 174). Une étude utilisant des analyses transcriptomiques extensives basées sur des puces à ADN a mis en évidence un très grand nombre de gènes surrénaux (269) régulés différemment selon le genre, parmi lesquels 71 étaient affectés par des modifications du milieu androgénique. Par exemple, on trouve *Nr5a1*, codant pour SF1 et *Nr0b1*, codant pour DAX1, qui sont exprimés plus fortement chez les femelles. Une étude précédente a également rapporté que les androgènes régulaient négativement *Nr0b1* chez les mâles (175). Comme ces facteurs régulent la stéroïdogénèse, il est tentant de spéculer que ces différences pourraient en partie expliquer la synthèse plus importante d'hormones stéroïdiennes chez les femelles (176). D'un point de vue développemental, le gène *Cyp17* est fortement exprimé chez les femelles et faiblement chez les mâles à e14.5, et son expression disparaît chez les mâles à e18.5 mais pas chez les femelles. L'importance de cette expression dimorphique n'est pas bien comprise.

Il est important de mentionner que l'incidence de nombreuses pathologies surrénales est drastiquement plus élevée chez les femmes, comme le syndrome de Cushing (177), la maladie d'Addison (178) et les cancers adrénocorticaux (179, 180). Ce phénomène a également été reproduit dans des modèles de souris transgéniques. Par exemple, l'activation constitutive de la β -caténine dans le cortex a déclenché le développement de carcinomes adrénocorticaux chez certaines femelles âgées, mais pas chez les mâles (114). Il a été suggéré que la susceptibilité accrue des femelles aux pathologies surrénales pourrait être due au plus haut taux de renouvellement cortical chez celles-ci.

1.5 Interactions entre le cortex et la médulla

Le contact anatomique intime entre le cortex et la médulla a rapidement soulevé l'hypothèse d'une interaction fonctionnelle entre ces deux tissus d'origine embryonnaire différente. En effet, des analyses ultrastructurelles ont démontré qu'ils sont en contact direct, sans tissu conjonctif ni membrane interstitielle les séparant. De plus, le flot sanguin provient du plexus artériel externe et se dirige vers la

médulla de manière centripète, collectant des hormones stéroïdiennes en traversant le cortex (181). De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ainsi que des observations cliniques ont permis de conclure que ces deux tissus sont interdépendants.

1.5.1 Régulation de la différenciation et de la fonction des cellules chromaffines par le cortex surrénalien

Le cortex surrénalien régule la synthèse de catécholamines par la médulla. Wurtman et Axelrod ont démontré en 1965 que la synthèse d'épinéphrine est influencée par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Dans cette étude, l'activité de la phényléthanolamine-N-méthyltransférase, une enzyme qui transforme la norépinéphrine en épinéphrine dans la médulla, était sévèrement diminuée après une hypophysectomie, et redevenait normale suite à l'administration d'ACTH ou de dexaméthasone (182). Des études sur des cultures de cellules chromaffines ont démontré que la tyrosine hydroxylase (TH), qui métabolise la tyrosine en dihydroxyphénylalanine, et la dopamine- β -hydroxylase, qui convertit la dopamine en norépinéphrine, sont également influencées par les glucocorticoïdes (183). L'administration de dexaméthasone *in vivo* chez des rats a augmenté l'expression de TH (184).

Les hormones stéroïdiennes jouent aussi un rôle dans la différenciation et le maintien des cellules chromaffines. Lorsque les cellules chromaffines sont mises en culture seules, elles perdent leur capacité de produire des catécholamines et une croissance neuritique se produit. L'ajout de dexaméthasone inhibe la formation de neurites et maintient l'identité endocrine (185).

Dans un modèle de souris *GR*^{-/-} (récepteur aux glucocorticoïdes), la médulla était absente et les surrénales ne produisaient pas de catécholamines (39). Une autre étude basée sur un modèle de souris déficientes en GR a toutefois remis en cause l'importance des glucocorticoïdes pour le développement des cellules chromaffines puisque les souris mutantes avaient un nombre normal de cellules chromaffines avec une ultrastructure normale, mais les enzymes PNMT et sécrétogranine II étaient absentes (186). Comme expliqué plus tôt, les souris *Sf1*^{+/-} ont une médulla peu développée et excentrique, suggérant que SF1 est critique pour l'organisation et la croissance de la médulla (88). L'inactivation de d'autres gènes corticaux ont également engendré des anomalies de la médulla (*21-hydroxylase* (187), *Corticotropin-releasing hormone type 1 receptor (CRH1R)* (188), *Cited2* (91), *Shh* (134), β -caténine (115), etc.)

1.5.2 Régulation de la fonction du cortex par la médulla

Bien que l'ACTH et l'angiotensine soient les plus puissants stimuli de la stéroïdogénèse, plusieurs facteurs paracrines produits par les cellules chromaffines la régulent également. Par exemple, les

catécholamines (183) et des neuropeptides comme les encéphalines, l'acétylcholine, le *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP), la substance P, la galanine et des dérivés de chromogranine stimulent la stéroïdogénèse. D'autres peptides l'inhibent, comme l'adrénomédulline, le neuropeptide Y, la dopamine et l'ANP (183, 189). Dans une étude *in vitro*, la production de cortisol par des cellules adrénocorticales bovines en co-culture avec des cellules chromaffines étaient 10 fois supérieure à la culture adrénocorticale pure (190). Chez les souris *TH^{-/-}* déficientes en catécholamines, les cellules adrénocorticales présentent une augmentation des liposomes avec des mitochondries tubulaires ayant une diminution des membranes internes, accompagnés d'une diminution de la corticostérone plasmatique. Ces changements suggèrent une hypofonction du cortex et confirment l'interdépendance cortico-médullaire (191).

2. Voie de signalisation Hippo

L'apparition d'organismes multicellulaires fut un évènement clé dans l'évolution. La multicellularité requiert des mécanismes permettant d'assurer le maintien de la taille, de la forme et de l'identité des différents tissus formant un organisme. La voie de signalisation Hippo, découverte il y a un peu plus de deux décennies, s'est avérée jouer un rôle fondamental dans la régulation de la taille des organes et de l'homéostasie en contrôlant la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation et les cellules souches.

2.1 Découverte de la voie Hippo chez la drosophile

La protéine kinase clé de la voie Hippo, codée par le gène *warts* (*wts*), a été découverte en 1995 dans une étude de criblage génétique chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) qui visait à identifier des gènes suppresseurs de tumeurs (192, 193). Une mutation de *warts* engendre un phénotype d'hyperprolifération cellulaire avec une diminution de l'apoptose et le développement de tumeurs. Plus tard, des études similaires ont permis d'identifier que la délétion des gènes *Hippo* (*hpo*), *Salvador* (*sav*) et *Mats* (*mats*; *Mob as tumor suppressor*) résulte en un phénotype similaire (194-198) et ces gènes se sont avérés être des composantes de la cascade Hippo, qui était alors appelée la voie Salvador-Warts-Hippo. *Yorkie* (*yki*), l'effecteur de la voie, a été identifié en 2005 et agit comme co-activateur transcriptionnel. *Yorkie* est phosphorylé et régulé négativement par WTS. Des études d'épistasie génétique ont permis de placer *Yorkie* en aval de SAV, WTS et HPO dans la cascade. Des mutations inactivant le gène *Yorkie* entraînent une diminution de la prolifération, alors que sa surexpression cause une surcroissance tissulaire (199).

D'un point de vue mécanistique, la protéine HPO, aidée par le cofacteur SAV, phosphoryle et active WTS. Par la suite, WTS interagit avec MATS pour faciliter la phosphorylation subséquente de Yorkie par WTS. Une fois phosphorylé, Yorkie est maintenu dans le cytoplasme par des protéines 14-3-3 (200, 201). Lorsque la voie est inactivée, Yki n'est pas phosphorylé et peut pénétrer le noyau, où il interagit avec le facteur de transcription *Scalloped* (Sd), un membre de la famille *TEA domain* (TEAD), pour réguler l'expression de ses gènes cibles (202, 203) (Figure 8).

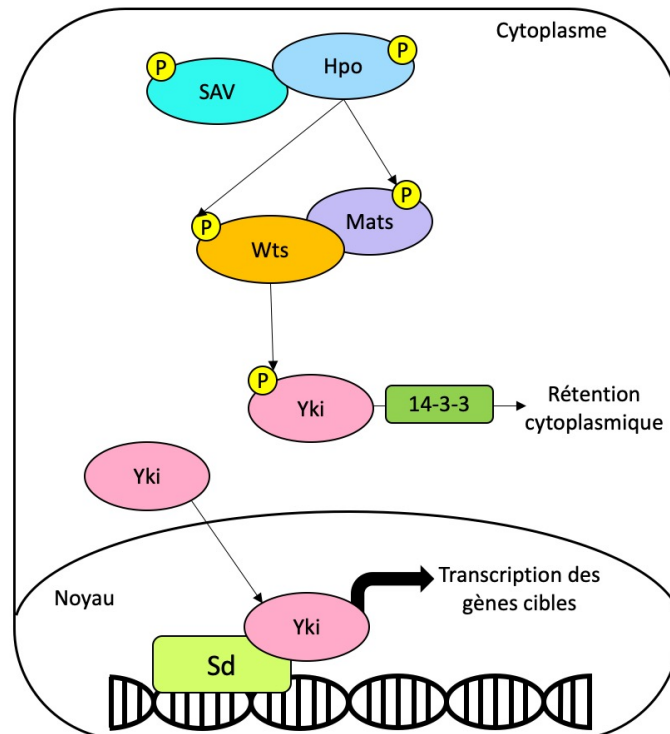


Figure 8. Voie de signalisation canonique Hippo chez la drosophile
Modifié de Zhao, 2010 (204).

2.2 Voie de signalisation Hippo canonique chez les mammifères

La voie de signalisation Hippo consiste en une cascade de kinases similaire à celle de la drosophile (Tableau 1) qui régule ultimement la localisation cellulaire et la stabilité des co-activateurs transcriptionnels *Yes-associated protein* (YAP) et *Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif* (TAZ) aussi connu sous le nom *WW domain-containing transcription regulator protein 1* (WWTR1), les principaux effecteurs de la voie.

Drosophile	Mammifères
HIPPO (HPO)	MST1, MST2
WARTS (WTS)	LATS1, LATS2
SALVADOR (SAV)	SAV1
MOB AS TUMOR SUPPRESSOR (MATS)	MOB1A, MOB1B
YORKIE (YKI)	YAP, TAZ
SCALLOPED (SD)	TEAD1, TEAD2, TEAD3, TEAD4

Tableau 1. Équivalence des composantes de la voie Hippo entre la drosophile et les mammifères

Lorsque la voie est activée (Figure 9), les kinases *mammalian sterile twenty-like* 1 et 2 (MST1 et MST2) aussi connues respectivement sous les noms *serine/threonine kinase* 4 et 3 (STK4/3) forment des hétérodimères avec leur protéine régulatrice SAV1 via leur domaine *C-terminal SARAH (Salvador–Ras association (RA) domain family (RASSF)–Hippo)*. Cette interaction forme un complexe enzymatique actif qui est requis pour que MST1/2 phosphorylent SAV1, MOB1A/B et les kinases *Large tumor suppressor 1/2* (LATS1 et LATS2) (205-207). La phosphorylation de MOB1 l’active, ce qui lui permet de se lier au site auto-inhibiteur sur LATS1/2, levant son auto-inhibition, et induisant l’auto-phosphorylation de LATS1/2 (205, 207, 208). Ensuite, le complexe activé LATS1/2-MOB1A/B phosphoryle à son tour les co-activateurs transcriptionnels YAP et TAZ à plusieurs sites, ce qui les inactive (199, 209). Selon le site de phosphorylation, YAP/TAZ peuvent être séquestrés dans le cytoplasme suite à la liaison à la protéine 14-3-3 ou peuvent subir une phosphorylation subséquente par la kinase caséine 1 (CK1). Cette phosphorylation va activer un motif de dégradation appelé le phosphodégron, menant au recrutement de β -TrCP et à l’ubiquitination et la dégradation protéasomale de YAP/TAZ (209-211).

Lorsque la voie Hippo est inactivée, YAP et TAZ sont non-phosphorylés et peuvent transloquer dans le noyau. Ils ne possèdent pas de domaine de liaison à l’ADN, donc ils se lient aux facteurs de transcription de la famille TEAD pour induire la transcription de gènes cibles (212, 213). Lorsque YAP/TAZ sont absents du noyau, TEAD agit plutôt comme répresseur de la transcription en se liant au transcription *cofactor vestigial-like protein 4* (VGLL4) (214) (Figure 9). En plus de se lier aux facteurs de transcription de la famille TEAD, YAP/TAZ peuvent aussi se lier à d’autres facteurs de transcription tels que p73 (215), *EGFR family member v-Erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4* (ERBB4) (216), *Early growth response protein 1* (EGR-1) (217), *Runt-related transcription factors* (RUNXs) (218), *SMAD family members* (SMADs) (219), TBX5 (220) et *Forkhead box protein O1* (FOXO1) (221).

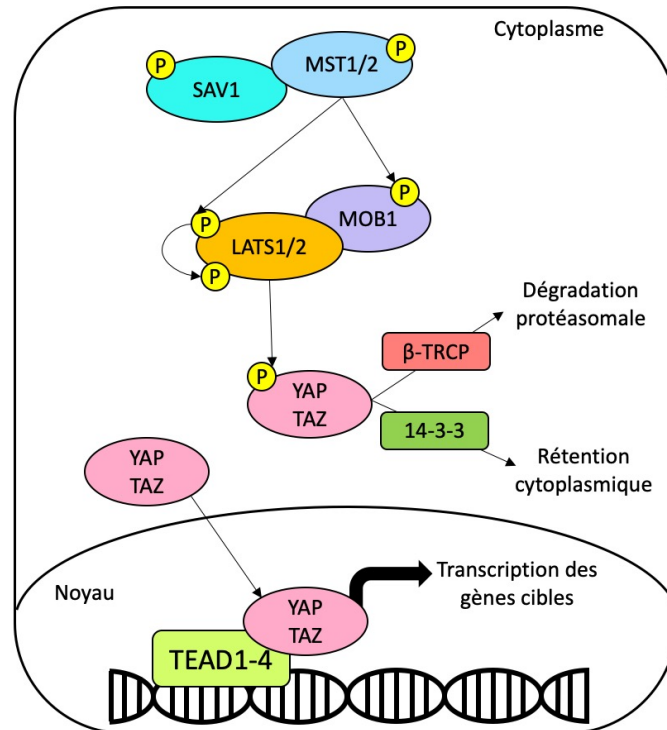


Figure 9. Voie de signalisation canonique Hippo chez les mammifères
Modifié de Piccolo, 2014 (222).

2.3 Effecteurs de la voie Hippo

2.3.1 Large tumor suppressor 1 et 2 (LATS1/2)

2.3.1.1 Structure

LATS1 et LATS2 sont des protéines kinases sérine/thréonine appartenant à la sous-famille AGC (223). Les deux LATS partagent jusqu'à 85% de similarité au niveau de leur domaine kinase localisé à l'extrémité C-terminale, mais leur extrémité N-terminale est différente (224). Il y a un motif hydrophobique près du domaine catalytique (223). À l'extrémité N-terminale, il y a deux séquences (LCD1 et 2) conservées requises pour la régulation et la fonction des LATS (225) ainsi qu'un domaine associé à l'ubiquitine, permettant de lier des protéines ubiquitinées favorisant son activation (226). LATS1/2 possèdent également des régions propres à chacun, leur conférant différentes fonctions. Par exemple, l'extrémité N-terminale de LATS1 contient un domaine riche en proline (227), tandis que LATS2 possède une région PAPA répétée (224). Une autre différence majeure est que LATS1 contient 2 motifs PPxY, essentiels pour l'interaction avec YAP/TAZ alors que LATS2 en a un seul (228) (Figure 10).

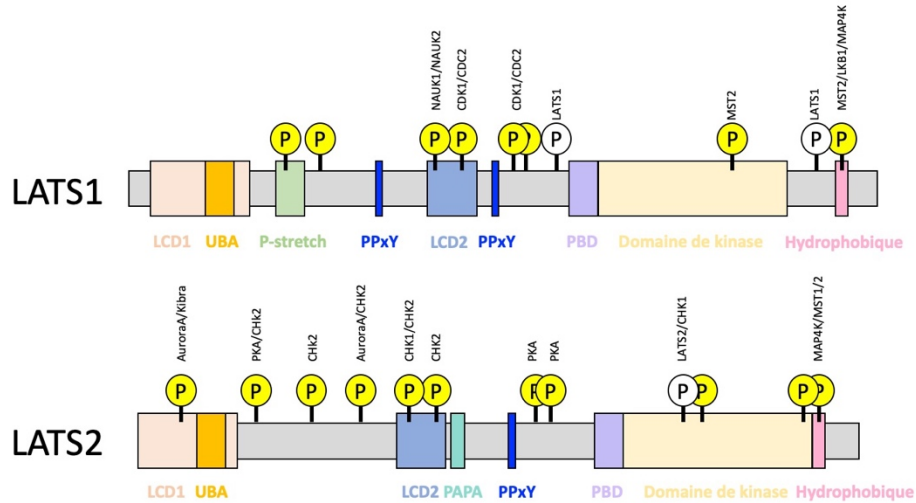


Figure 10. Structure simplifiée des kinases LATS1 et LATS2 humaines.

Les cercles jaunes contenant la lettre P représentent les sites de phosphorylation et les éléments qui effectuent la phosphorylation sont indiqués au-dessus. La structure moléculaire n'est pas à l'échelle. Modifié de Furth, 2017 (229).

2.3.1.2 Régulation de LATS1/2

Régulation de l'expression génique

Dans un contexte tumoral, il a été démontré que l'expression de *Lats1/2* était inactivée par des mutations (230), des processus épigénétiques et l'hyperméthylation des promoteurs (231). Dans des conditions physiologiques ou lors de stress métabolique ou génotoxique, la protéine suppresseur de tumeur p53 peut réguler positivement la transcription de *Lats2* directement. Il y a une boucle de rétrocontrôle dans laquelle *Lats2* renforce la stabilité de p53 (232-234). Aussi, YAP/TAZ et les facteurs de transcription TEADs activent directement l'expression de LATS2 (mais pas LATS1); il pourrait s'agir d'un mécanisme de rétrocontrôle servant à maintenir l'homéostasie et atténuer les effets oncogéniques d'un excès de YAP (235, 236). Après la transcription, des microARN peuvent réguler positivement ou négativement l'expression de LATS1/2 (237).

Régulation post-traductionnelle

LATS1/2 sont régulés de manière post-traductionnelle par un mécanisme de phosphorylation-autophosphorylation : MST1/2 phosphorylent LATS1 sur Ser909 et Thr1079 et LATS2 sur Thr1041 pour augmenter leur activité (207, 238). Comme expliqué plus tôt, MOB1 se lie au domaine hydrophobique de LATS1/2 pour lever leur auto-inhibition et faciliter leur auto-phosphorylation sur les résidus

Ser674/Ser1049 et Ser 835, respectivement (206). Les kinases LATS peuvent aussi être dé-phosphorylées par PP2A pour empêcher l'activation de LATS1 par MST (205, 206). Il faut mentionner que MST1/2 ne sont pas les seuls à pouvoir activer les kinases LATS. En effet, la délétion de *Mst* dans le foie murin résulte en hyperactivité de YAP sans réduction de la phosphorylation de LATS (239). D'autres kinases peuvent également phosphoryler LATS1/2 sur leurs motifs hydrophobiques, incluant MAP4K1/2/3/5, MAP4K4/6/7 et les kinases TAO (TAOK1/2/3) (240-243). LATS1/2 peuvent aussi être phosphorylés par d'autres mécanismes indépendamment de la voie Hippo. Pour ne donner que quelques exemples, LATS2 est phosphorylé par les *Checkpoint kinases 1 et 2* (CHK1/2) en réponse à un dommage à l'ADN induit par des rayons ultraviolets (244). Durant la mitose, LATS1 est phosphorylé par CDK1/CDC2 (245) et LATS2 par Aurora A (246). De plus, la stabilité protéique est un autre moyen de réguler LATS1/2. La phosphorylation de LATS1 par NUA1 diminue grandement sa stabilité (247), tandis que la protéine *Kidney and brain* (KIBRA) stabilise LATS2 et inhibe son ubiquitination en le phosphorylant (248). L'ubiquitination de LATS1/2 par NEDD4 mène à leur dégradation (249). De plus, des ligases E3 avec un domaine *WW* comme *Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase* (ITCH) et *WW Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1* (WWP1) déstabilisent aussi LATS1 et peuvent même déplacer YAP/TAZ du site de liaison PPXY (250-252). Finalement, la localisation de LATS1/2 dans la cellule est aussi importante pour leur régulation et leur fonction. Par exemple, LATS1/2 ont été détectés au niveau des centrosomes, ce qui pourrait être associé à leur rôle dans la régulation de la mitose (227). La localisation de LATS2 dans le noyau est très importante pour potentialiser l'activité de p53 (253).

2.3.1.3 Fonctions

Le rôle principal de LATS1/2 est de réguler l'activité de YAP et TAZ dans la voie canonique Hippo. Au-delà de ce rôle, LATS1/2 ont de nombreuses autres fonctions indépendantes d'Hippo. Il faut aussi savoir qu'il y a un important chevauchement fonctionnel et structurel entre LATS1 et LATS2, mais qu'ils peuvent avoir des fonctions distinctes dans certains contextes et peuvent être régulés différemment. LATS1/2 répondent à de nombreux signaux intra et extra-cellulaires qui contrôlent un très vaste éventail de fonctions biologiques comme le cycle cellulaire, la différenciation et la motilité cellulaire (révisé dans (229)). Par exemple, dans le cycle cellulaire, LATS1 empêche la transition entre les phases G2 et M en se liant à la *Cyclin-dépendant kinase 1* (CDK1) alors que LATS2 bloque la transition G1/S en inhibant le complexe *Cyclin E/Cyclin-dépendant kinase 2* (CDK2), ce qui limite la prolifération cellulaire (245, 254, 255). LATS1/2 ont également des rôles bien établis dans le contrôle de l'apoptose. Par exemple, LATS1 peut accentuer l'expression de la protéine pro-apoptotique BAX (256) et LATS2 peut diminuer l'expression des

protéines anti-apoptotiques BCL-xL et BCL2 (257). L'axe fonctionnel LATS2-p53 régule aussi le cycle cellulaire et l'apoptose (258). Dans le noyau, LATS2, mais pas LATS1, influence l'épigénome des cellules HeLa S3 en se liant au complexe protéique *Polycomb repressive complex 2* (PRC2), en le phosphorylant et en affectant son activité méthyltransférase et la tri-méthylation subséquente de l'histone H3 (259). Dans la prostate, LATS2 inhibe la liaison du récepteur aux androgènes à la chromatine et son activité transcriptionnelle (260). Dans la glande mammaire, LATS1/2 inhibe l'activité de transcription du récepteur à l'œstrogène alpha soit directement, soit indirectement en modulant divers co-répresseurs et co-activateurs de manière indépendante de la voie Hippo. LATS1/2 peuvent se lier au récepteur à l'œstrogène et promouvoir sa dégradation protéasomale. Ceci influence le destin des cellules mammaires (261, 262).

2.3.2 YAP et TAZ

2.3.2.1 Structure de YAP et TAZ

YAP et TAZ sont des protéines homologues qui ont certains domaines en commun. Une portion de la région N-terminale de YAP/TAZ interagit avec les facteurs de transcription TEAD1-4 (263, 264). YAP/TAZ contiennent un ou deux domaines WW vers le centre de la protéine et un domaine de transactivation au niveau de l'extrémité C-terminale. Ils ont aussi un domaine enroulé en spirale (*coiled-coil*) et un motif de liaison PDZ (265). YAP a la particularité d'avoir un domaine riche en proline à son extrémité N-terminale et un motif de liaison SH3 après le deuxième domaine WW, par où il interagit avec la tyrosine kinase Yes Proto-Oncogene 1 (Yes) (263). TAZ ne possède pas le domaine riche en proline ni le motif de liaison SH3, donc il n'interagit sûrement pas avec Yes (révisé dans (266)) (Figure 11).

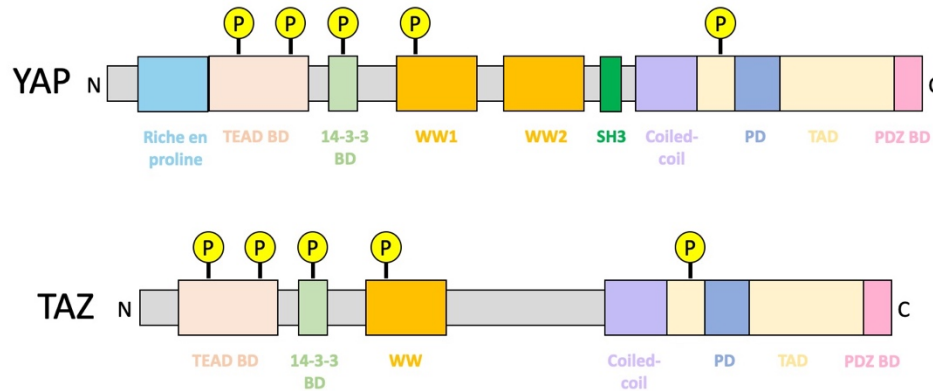


Figure 11. Structure simplifiée des domaines de YAP et TAZ.

Les cercles jaunes contenant la lettre P représentent les sites de phosphorylation de LATS1/2. BD : *Binding domain*, PD : Phosphodégéron. Modifié de Piccolo, 2014 (222).

2.3.2.2 Régulation de YAP et TAZ

Régulation de l'expression génique

Les mécanismes de régulation de l'expression de YAP et TAZ ont peu été étudiés à ce jour. Nous savons que le facteur de transcription *GA Binding Protein* (GABP) peut se lier au promoteur de *Yap* pour activer sa transcription et que la déplétion de GABP diminue l'expression de YAP, ce qui bloque le cycle cellulaire en G1/S et augmente la mort cellulaire. Puisque GABP est inactivé par les mécanismes oxydatifs, il a été suggéré que YAP participerait ainsi aux mécanismes de défense contre les oxydants (267). Également, lors du processus de différenciation de cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes ou en adipocytes, il a été démontré que le *SRY-Box Transcription Factor 2* (SOX2) régule directement l'expression de *Yap* en se liant à son promoteur et en activant sa transcription, indépendamment de la cascade Hippo, afin de déterminer le destin ostéogénique ou adipocytaire. L'ostéogénèse est bloquée par une forte expression de SOX2 ou YAP et accélérée par leur déplétion. L'adipogenèse nécessite plutôt un niveau modéré de YAP (268).

Régulation post-traductionnelle

Un des principaux mécanismes de régulation de YAP/TAZ est leur phosphorylation par LATS et leur ubiquitination via la cascade Hippo. YAP et TAZ ont respectivement 5 et 4 séquences HxRxxS (H : histidine, R : arginine, S : sérine, X : autre acide aminé) pouvant être phosphorylées par LATS1/2, les principaux résidus étant Ser127 pour YAP et Ser89 pour TAZ (199, 264, 269, 270). La phosphorylation de ces sites génère des sites de liaison pour les protéines 14-3-3. La phosphorylation des résidus Ser397 de YAP et

Ser311 de TAZ par LATS entraîne la phosphorylation de Ser400/Ser403 de YAP et Ser314 de TAZ par la kinase caséine ϵ/δ , ce qui mène à l'ubiquitination de YAP/TAZ et leur dégradation par la voie SCF β -TrCP (210, 211) comme expliqué plus tôt (révisé dans (266)).

D'autres kinases peuvent également phosphoryler YAP/TAZ indépendamment de la cascade Hippo comme *Abelson tyrosine kinase* (C-ABL), *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), YES, *Proto-oncogen c-Src* (SRC), Protéine kinase B (AKT), p38, CDK1 et *Nima-related protein kinase 1* (NEK1). La phosphorylation de YAP par C-ABL et JNK favorise l'apoptose. La phosphorylation de YAP par YES induit plutôt la formation d'un complexe appelé YAP1- β -catenin-T-box5 (TBX5) qui interagit avec le promoteur des gènes anti-apoptotiques afin de promouvoir la survie des lignées cellulaires β -caténine-actives (271). La phosphorylation par AKT cause la rétention cytoplasmique de YAP par les protéines 14-3-3 de manière similaire à la voie Hippo (270). La phosphorylation de YAP par CDK1 permet de réguler le cycle cellulaire (272). À l'inverse, les protéines phosphatases PP1A et PP2A contrebalancent LATS1/2 en déphosphorylant YAP et TAZ (266, 273, 274).

2.3.2.3 Gènes cibles de YAP/TAZ

Les effecteurs de la voie Hippo YAP et TAZ exécutent leurs fonctions biologiques en induisant l'expression de nombreux gènes cibles. Des études génomiques à haut débit dans différents tissus ont révélé que le patron d'expression génique n'est pas constant, mais dépend plutôt du type cellulaire, des signaux reçus par la cellule et des partenaires de liaison à l'ADN utilisés par YAP et TAZ. Par exemple, dans les fibroblastes associés au cancer, la transcription des gènes *Angiomotin Like 2* (*Amotl2*), *Ankyrin Repeat Domain 1* (*Ankrd1*), *Anillin Actin Binding Protein* (*Anln*), *Connective tissue growth factor* (*Ctgf*), *Diaphanous Related Formin 3* (*Diaph3*) et *Serum deprivation-response protein* (*Sdpr*) est régulée par YAP et ces gènes sont requis pour le remodelage de la matrice extra-cellulaire (MEC), le maintien du phénotype fibroblastique et l'invasion cellulaire (275). Dans les cellules mammaires humaines, *Ctgf* a été identifié comme une cible directe majeure de YAP-TEAD, où il participerait aux effets oncogéniques de YAP tels que la stimulation de la prolifération et la progression tumorale (212). L'analyse de puces à ADN de foie murin a révélé que YAP induit la transcription de plusieurs gènes associés à la prolifération des hépatocytes comme le marqueur de prolifération *Ki67*, le proto-oncogène *c-myc*, *SRY-Box Transcription Factor 4* (*Sox4*), *H19 Imprinted Maternally Expressed Transcript* (*H19*) et *Alpha Fetoprotein* (*Afp*). Il stimule aussi la transcription de plusieurs inhibiteurs de l'apoptose comme *Baculoviral IAP Repeat Containing 5* (*Birc5*)/Survivin et *Birc2/Cellular Inhibitor of Apoptosis protein 1* (*ciAP1*) ainsi que le gène *MCL1 Apoptosis Regulator* (*Mcl1*), un membre de la famille Bcl2 (200). Parmi les autres gènes cibles bien établis de

YAP/TAZ, on retrouve le *Cellular Communication Network Factor (CCN1)/Cysteine Rich Angiogenic Inducer 61 (Cyr61)*, *AXL Receptor Tyrosine Kinase (Axl)*, *Inhibin Subunit Alpha (InhA)*, *Collagen Type VIII Alpha 1 Chain (Col8a1)* et de nombreux autres. Malgré la grande variété de gènes ciblés par la voie Hippo, une liste des gènes les plus souvent régulés par YAP et TAZ a été établie, appelée la *conserved YAP signature* (212, 276). Parmi ces gènes, *Ctgf* et *Cyr61* sont les marqueurs les plus constants de l'activation de YAP.

2.4 Régulation de la voie Hippo

2.4.1 En amont de la voie

Contrairement à la majorité des voies de signalisation, la voie Hippo n'est pas constituée d'un système traditionnel de ligands et de récepteurs spécifiques. Elle est plutôt régulée par un vaste éventail de signaux intra et extra-cellulaires qui dépendent du type cellulaire et du contexte. Les signaux de stress, la polarité cellulaire, les contacts cellule-cellule, le cycle cellulaire, les récepteurs couplés aux protéines G et les signaux mécaniques sont tous d'importants modulateurs de la cascade.

2.4.1.1 Signaux de stress

Puisque YAP et TAZ stimulent la prolifération et la survie cellulaire en règle générale, il n'est pas surprenant que leur activité soit modulée par divers signaux de stress. Par exemple, MST1/2 peuvent être activés par un coup de chaleur, une forte concentration d'arsénite de sodium (277) et du peroxyde d'hydrogène. De plus, il a été démontré que MST1 participait à la mort cellulaire induite par le stress oxydatif en activant directement les facteurs de transcription FOXO dans les neurones (278). Le stress énergétique causé par une déficience en glucose induit la phosphorylation de YAP/TAZ par LATS1/2 (279). L'accessibilité de d'autres nutriments affecte aussi la voie Hippo ; chez la drosophile, les kinases salt-induced kinase 2/3 phosphorylent SAV pour promouvoir l'expression des gènes cibles de Yorkie (280). L'inhibition de la synthèse de cholestérol inhibe indirectement YAP (281). Il est rapporté que le stress osmotique augmente l'activité de YAP (282). Enfin, l'hypoxie induit l'activation de YAP/TAZ en déstabilisant LATS2 via le recrutement de SIAH2, une ubiquitine ligase E3 (283).

2.4.1.2 Polarité cellulaire et adhésion cellule-cellule

Les tissus épithéliaux sont caractérisés par la présence de structures spécialisées qui assurent la cohésion entre les cellules : jonctions serrées, jonctions adhérentes et desmosomes (284). Les cellules épithéliales possèdent aussi une polarité, c'est-à-dire une orientation spatiale particulière avec une répartition caractéristique de certains organites aux pôles apical, basal et aux faces latérales. Ces

propriétés épithéliales sont impliquées dans la régulation de la voie Hippo par plusieurs mécanismes. En règle générale, l'activité de YAP et TAZ est plus faible dans les cellules épithéliales bien différenciées et plus forte dans les cellules progénitrices (285, 286).

La protéine Merlin, encodée par le gène *Neurofibromatosis type-2*, inhibe YAP/TAZ en agissant en amont de la voie Hippo de plusieurs manières. Dans les cellules épithéliales, Merlin est situé près des jonctions adhérentes et serrées. Cette localisation est essentielle à son rôle dans l'intégrité des jonctions cellulaires et comme suppresseur de tumeur (287-289). Merlin se lie avec la protéine Kibra, ce qui permet l'activation des kinases LATS et la phosphorylation subséquente de YAP/TAZ (248, 290, 291). Merlin peut aussi se lier directement à LATS1/2 afin de les recruter à la membrane cytoplasmique pour qu'ils soient activés par MST-SAV (292).

Scribble est une protéine située à l'aspect baso-latéral de la membrane cytoplasmique qui joue un rôle important dans la polarité cellulaire. Elle permet d'assembler un complexe contenant les composantes de la voie Hippo (MST, LATS, TAZ) afin d'activer LATS (276). Il est important de noter que la perte des propriétés épithéliales (polarité, jonctions cellulaires) est un élément clé de la progression des tumeurs et constitue une des premières étapes à la transition épithéliale à mésenchymateuse (EMT), menant à l'invasion tumorale et aux métastases (293). Lors d'EMT, Scribble est fréquemment délocalisé et la voie Hippo est inactivée, comme il a été démontré dans des tumeurs mammaires (276).

L' α -caténine est une protéine adaptatrice, située entre la membrane cytoplasmique et le cytosquelette d'actine, impliquée dans les jonctions adhérentes et associée avec E-cadhérine. Elle agit comme suppresseur de tumeur en bloquant la localisation nucléaire et l'activité de YAP (294, 295). Le complexe protéique Crumbs au pôle apical est aussi impliqué dans la polarité cellulaire et régule la voie Hippo. Ce complexe contient la protéine transmembranaire Crumbs et les protéines cytoplasmiques Pals et Patj. Il se lie à YAP et TAZ pour favoriser leur localisation dans le cytoplasme par un mécanisme incertain (296). Il pourrait agir en amont ou en aval de Scribble ou réguler les angiomotines (AMOT). Ces dernières, situées au niveau des jonctions serrées (297), se lient à LATS1/2 et à YAP/TAZ et peuvent activer la cascade de kinases Hippo ou participer à la séquestration de YAP/TAZ dans le cytoplasme (298-301). Toutefois, il a été démontré plus tard que les angiomotines pouvaient aussi activer YAP dépendamment du contexte (302).

2.4.1.3 Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est l'ensemble des étapes de la vie d'une cellule, incluant des phases de prolifération et de quiescence. Plusieurs études ont démontré que les composantes de la voie Hippo sont affectées par le cycle cellulaire, mais les mécanismes impliqués sont mal compris. En 1999, Tao et *al.* ont découvert que l'état de phosphorylation de LATS1 dépend du cycle cellulaire et que la kinase forme un complexe avec CDC2 pour le réguler négativement, ce qui pourrait contribuer à son rôle de suppresseur de tumeur. Dans leur étude, ils ont montré que LATS1 est phosphorylé entre G2/M ou au début de la prophase et est déphosphorylé à la jonction de la métaphase et de l'anaphase dans des cellules immortalisées humaines HeLa (245). D'autres études ont trouvé que YAP et TAZ sont également phosphorylés à plusieurs sites par CDK1 durant la phase G2/M (272, 303-305).

2.4.1.4 Protéines solubles et récepteurs couplés aux protéines G

De nombreuses molécules extracellulaires comme les hormones et les facteurs de croissance peuvent réguler la voie Hippo en se liant à des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces récepteurs membranaires sont très abondants chez les mammifères et permettent de moduler les activités cellulaires en réponse à des signaux distaux (306). La signalisation par les RCPG peut affecter l'activité de YAP/TAZ positivement ou négativement selon le type de protéine G, en modulant les Rho-GTPases et l'actine F (307, 308). Par exemple, les ligands associés aux protéines $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_{i/o}$ ou $G\alpha_{q/11}$ comme l'acide lysophosphatidique, la thrombine, l'angiotensine II et l'œstrogène activent YAP/TAZ tandis que les ligands associés aux protéines $G\alpha_s$, tels que le glucagon et l'épinéphrine, inhibent YAP/TAZ (307, 309). D'autres facteurs solubles peuvent moduler la cascade Hippo indépendamment des RCPG comme les cytokines, les *vascular endothelial growth factors* (VEGFs) (310), Wnt, TGF- β (311), l'insuline, etc. (306)

2.4.1.5 Mécanotransduction

Les cellules reçoivent constamment des signaux mécaniques générés par l'état de leur cytosquelette, leur forme, l'attachement des cellules et leur microenvironnement physique (rigidité de la MEC), forces de tension causées par les cellules adjacentes). La mécanotransduction consiste à traduire ces signaux mécaniques en signaux biochimiques afin de prendre des décisions cruciales, comme proliférer *versus* se différencier, pour maintenir l'homéostasie tissulaire et s'adapter aux contraintes physiques (312). Les signaux mécaniques représentent un des mécanismes les plus importants pour réguler l'activité de YAP/TAZ (222).

Lorsqu'une cellule dispose d'une grande surface adhésive de MEC, elle tend à s'étirer et à subir un haut niveau de stress mécanique. Le cytosquelette s'adapte en formant, entre autres, des fibres d'actine filamenteuse (actine F), ce qui active YAP/TAZ et stimule la prolifération cellulaire au détriment de la différenciation (312). À l'inverse, une cellule ayant peu de surface adhésive adoptera une forme ronde et compacte, causant l'inactivation de YAP/TAZ et leur exclusion du noyau, ce qui favorisera plutôt la différenciation (312). La rigidité de la MEC est un autre régulateur important de YAP/TAZ; lorsque la MEC est rigide, YAP/TAZ sont activés/non-phosphorylés et localisés au noyau et vice versa. Cette régulation est indépendante de la voie Hippo et prime sur celle-ci. En effet, la délétion de LATS1/2 n'a pas pu empêcher l'inactivation de YAP/TAZ dans des cellules en culture sur des MEC synthétiques souples ou des petites surfaces adhésives (312, 313). Le détachement des cellules de la matrice extra-cellulaire active LATS1/2 via des modifications du cytosquelette, ce qui induit la mort cellulaire par anoïkose (314). Finalement, l'architecture tissulaire et les contacts cellule-cellule restreignent la prolifération des cellules, un phénomène appelé l'inhibition de contact. En culture, YAP et TAZ sont localisés dans le noyau et actifs lorsque la densité cellulaire est faible et deviennent cytoplasmiques/inactifs lorsqu'il y a confluence (forte densité cellulaire) sous le contrôle de la voie Hippo (209, 315).

2.4.2 Interactions avec d'autres voies de signalisation

2.4.2.1 Voie de signalisation Wnt/ β -caténine

Les WNT sont une famille de facteurs de croissance impliqués notamment dans la régulation de la prolifération cellulaire, les cellules souches, la régénération et le développement de tumeurs (316, 317). La voie de signalisation a été expliquée en détails dans la section 1.4.2.3. Depuis une dizaine d'années, on a découvert que les voies canoniques Wnt et Hippo interagissent à plusieurs niveaux bi-directionnellement afin de permettre une très fine régulation des processus cellulaires. La nature de ces interactions et leurs conséquences semblent être tissu-dépendantes. Seuls quelques exemples seront discutés afin de dresser un portrait global.

D'abord, YAP et TAZ font partie du complexe de destruction de la β -caténine (318). La formation de ce complexe cause la séquestration cytoplasmique de YAP et TAZ. Lorsque la voie Wnt est inactivée, ils s'associent à l'Axin, ce qui permet de recruter β -TrCP et ainsi d'entraîner la dégradation de la β -caténine. La β -caténine phosphorylée peut aussi faciliter la dégradation de TAZ par β -TrCP, mais pas de YAP (319). L'arrivée d'un ligand WNT (activation de la voie) induit l'association entre le récepteur LRP6 et l'Axin tout en relâchant YAP/TAZ du complexe de destruction (318). Cette libération de YAP/TAZ leur permet de se

rendre au noyau pour réguler la transcription. À l'inverse, la déplétion de YAP/TAZ permet l'activation de la β -caténine et de son activité transcriptionnelle via le TCF. À titre d'exemple, les souris *Taz null* développent des reins polykystiques avec une accumulation nucléaire de β -caténine (320).

La voie Hippo peut réguler la voie Wnt de d'autres manières. En effet, il a été démontré que TAZ bloque l'interaction entre CK1 δ/ϵ et DVL dans le cytoplasme, ce qui inhibe la phosphorylation de DVL induite par WNT3 et donc inactive la voie Wnt/ β -caténine (320). De plus, la kinase LATS2 a la capacité d'interagir avec la β -caténine dans le noyau pour empêcher son interaction avec son cofacteur BCL9 (321). Plusieurs études ont montré que l'expression de certains gènes semble être à la fois sous le contrôle de YAP/TAZ et de la β -caténine. C'est le cas pour *Sox2* et *Snai2* dans les cardiomyocytes (322). Dans les cellules cancéreuses colorectales, YAP et la β -caténine peuvent se lier au même facteur de transcription (TBX5) pour stimuler l'expression des gènes *Birc5* et *Bcl2l2* qui favorisent la survie cellulaire (271).

2.4.2.2 Voie TGF- β /SMAD

Les membres de la superfamille TGF- β (TGF- β s, activine, BMP, GDF, etc.) sont des facteurs de croissance qui jouent un rôle critique dans le développement embryonnaire et l'homéostasie tissulaire chez l'adulte (révisé dans (323-325)). Dans la voie canonique, un ligand TGF- β se lie au récepteur TGF- β de type II, entraînant le recrutement, la phosphorylation et l'activation du récepteur TGF- β de type I (326, 327). Celui-ci phosphoryle à son tour SMAD2/3, qui s'associent par la suite à SMAD4 (328). Le complexe activé SMAD2/3-4 transloque au noyau pour se lier aux éléments de liaison de SMAD (SMAD binding elements; SBE) pour la transcription de gènes cibles (329). SMAD7 agit plutôt comme inhibiteur de la voie; il se lie au récepteur TGF- β de type I pour empêcher la phosphorylation de SMAD2/3 et pour induire la dégradation protéasomale du récepteur par des ligases ubiquitine E3 (Smurf1/2, WW1) ou son inactivation par la phosphatase GADD34/PP1 (330). Au niveau de la transcription, *CREB binding protein* (CBP) et p300 servent de co-activateurs transcriptionnels (331) alors que SnoN et SKI agissent comme co-répresseurs (332) (révisé dans (324, 325, 333)) (Figure 12).

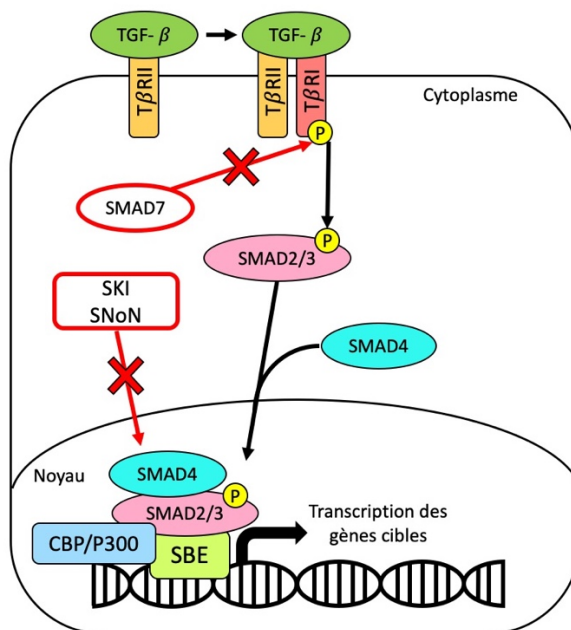


Figure 12. Voie de signalisation TGF-β/SMAD

Adapté de Mimoun, 2018 (333).

YAP/TAZ et les SMADs interagissent à plusieurs niveaux dans la cellule dépendamment du type cellulaire et du contexte. D’abord, YAP peut favoriser l’association entre SMAD7 et le récepteur TGF-β de type I pour inactiver la signalisation TGF-β (334). Ensuite, Varelas *et al.* (2008) ont défini TAZ comme un médiateur essentiel de la localisation cellulaire de SMAD (335). Lorsque la voie TGF-β est activée, TAZ se lie au complexe SMAD2/3-4 pour promouvoir la localisation nucléaire du complexe et son association à la machinerie transcriptionnelle. En absence de TAZ, le complexe SMAD2/3-4 est incapable de s’accumuler au noyau et d’activer la transcription. Dans cette étude, la perte de TAZ dans des cellules souches embryonnaires humaines a causé l’inhibition de la signalisation TGF-β et une diminution de l’expression de gènes associés à la pluripotence (*Oct4* et *Nanog*) (335). Le même groupe de recherche a aussi découvert que YAP et TAZ peuvent dicter la localisation cellulaire du complexe SMAD en fonction de la densité cellulaire. Lorsque la densité cellulaire est élevée dans une culture de cellules épithéliales, la voie Hippo est activée, donc YAP et TAZ sont phosphorylés et situés dans le cytoplasme, où ils séquestrent les complexes SMAD et inactivent ainsi la voie TGF-β (296). Ce phénomène se produit de manière cellulaire-dépendante, car il semble uniquement avoir lieu dans les cellules épithéliales polaires et n’a pas été observé dans les cellules mésenchymateuses ni dans certaines autres cellules épithéliales (336). Les interactions entre la voie TGF-β et Hippo sont complexes et plusieurs revues de littérature les expliquent plus en détails (323, 333).

2.4.2.3 Intégration des voies TGF- β , WNT et Hippo dans la fibrose

Pendant longtemps, les cascades de signalisation ont été étudiées de manière isolée, mais de plus en plus nous réalisons qu'elles sont en fait inter-reliées et qu'elles forment un réseau de signalisation d'une grande complexité, ce qui permet de réguler très finement les réponses cellulaires selon le contexte et l'environnement cellulaire. Par exemple, de profondes interactions entre les voies TGF- β , WNT et Hippo ont récemment été mises en évidence dans la fibrose des organes, dans l'optique de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour ralentir ce processus.

Lors de dommages chroniques, les mécanismes cellulaires et moléculaires de réparation sont perturbés, ce qui résulte en fibrose excessive du tissu et en l'altération de sa fonction et de son architecture (337). En effet, cette stimulation chronique entraîne la différenciation de plusieurs types cellulaires (fibroblastes, péricytes, cellules dérivées de la moelle osseuse, cellules épithéliales et endothéliales) en myofibroblastes (révisé dans (338)) et leur prolifération excessive. Dans un tissu cicatriciel normal, les myofibroblastes sont des cellules très actives qui servent à déposer de la MEC (collagène, glycoprotéines, protéoglycanes), à la contracter et à la remodeler (339). Les voies TGF- β , WNT et Hippo intègrent leurs signaux à plusieurs niveaux pour moduler la différenciation, la fonction des myofibroblastes et le développement de la fibrose.

Premièrement, l'activité d'une cascade de signalisation peut induire la production d'agonistes ou d'antagonistes d'une autre voie. Par exemple, la stimulation des fibroblastes par WNT3a augmente l'expression du ligand TGF- β 1 et favorise la différenciation en myofibroblastes (340). De plus, TGF- β peut aussi augmenter l'activité de la voie WNT en inhibant l'antagoniste Dickkopf-1 (DKK1), ce qui augmente la stabilité de la β -caténine et favorise sa localisation nucléaire dans les fibroblastes, favorisant la fibrose (341).

Deuxièmement, les trois voies interagissent aussi en modulant la rétention cytoplasmique et la dégradation des régulateurs transcriptionnels dans le cadre de la fibrose. Plusieurs exemples d'interactions avec la voie Hippo ont déjà été énumérés dans les sections précédentes (2.4.2.1 et 2.4.2.2). En se liant à YAP, SMAD7 a une plus grande affinité pour le récepteur de type I et son effet répressif sur la voie TGF- β est amplifié (219). D'ailleurs, SMAD7 interagit avec la β -caténine pour induire la dégradation médiée par SMURF2, ce qui atténue l'activité WNT dans la peau (119). Dans les fibroblastes non-stimulés, l'Axin facilite la liaison de SMAD3 au récepteur TGF- β de type I. Lorsque la voie TGF- β est activée, l'Axin favorise la phosphorylation de SMAD3 et sa dissociation du récepteur, donc l'Axin est un acteur important

de la communication entre les voies TGF- β et WNT dans le cytoplasme, menant à la transcription de gènes pro-fibrotiques (342).

Finalement, les voies peuvent interagir en affectant la localisation nucléaire des effecteurs et en modulant la transcription. Dans une expérience, l'inactivation de YAP a atténué l'expression de l'endothelin1 et de CTGF ce qui suggère de YAP contrôle l'expression de certains gènes cibles de TGF- β (343). L'expression de la métalloprotéinase 2 était augmentée, renforçant l'hypothèse que YAP interagit avec les SMADs pour diriger les cellules vers un phénotype fibrotique (338). Dans la fibrose, des cellules épithéliales peuvent se transdifférencier en un phénotype myofibroblastique (transition épithéliale à mésenchymateuse). À titre informatif, la transdifférenciation est un processus durant lequel une cellule non-souche ou une cellule déjà différenciée perd ses propriétés et acquiert de nouvelles propriétés et de nouvelles fonctions. Durant la transition de cellules épithéliales alvéolaires, la stimulation par les ligands TGF- β et WNT a un effet synergique sur l'expression de la protéine *Alpha smooth muscle actin* (α -SMA), exprimée par les myofibroblastes, et sur les facteurs de transcription TCF/LEF (voie WNT) (344). Concrètement, la β -caténine et SMAD3 se co-localisent sur le promoteur de α -SMA. Il a été démontré plus tard qu'ils régulaient ensemble l'expression de d'autres gènes impliqués dans la fibrogenèse (345). En plus, TGF- β peut induire la translocation nucléaire de la β -caténine en inactivant la dégradation médiée par GSK3 (338).

2.4.2.4 Autres voies de signalisation

La voie Hippo interagit avec plusieurs autres voies de signalisation comme la voie Hedgehog, *Notch*, *Jak/Stat*, *Jnk*, *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3-kinase)/AKT et les voies apoptotiques (323).

Une interaction entre la voie Hippo et la voie Sonic Hedgehog a été établie dans les médulloblastomes humains. Observée surtout chez les enfants, c'est une tumeur originant des précurseurs neuronaux cérébelleux (*cerebellar granule neuron precursors*) qui serait causée par une activation aberrante de la signalisation Shh. Il a été démontré que Shh favorise la surexpression de YAP et sa localisation dans le noyau dans ces médulloblastomes. YAP stimulerait la prolifération des précurseurs neuronaux cérébelleux (346).

La voie de signalisation PI3-kinase/AKT favorise la survie cellulaire. Elle interagit avec la voie Hippo de plusieurs manières. Lorsque la voie PI3-kinase est activée, AKT peut phosphoryler directement YAP pour faciliter la liaison aux protéines 14-3-3 (270). AKT peut aussi phosphoryler MST1 sur le résidu thréonine 387 entre autres, ce qui restreint son activité de kinase (347).

En lien avec l'apoptose, le proto-oncogène *Raf-1 proto-oncogen serine/threonine kinase* (RAF1) peut se lier à MST2 pour l'inhiber. De plus, la protéine RASSF1A, dont l'expression est souvent diminuée dans les cellules cancéreuses, empêche la liaison de RAF1 à MST2, ce qui active MST2 et par le fait même ses fonctions pro-apoptotiques (348). Dans le cytoplasme, la protéine *Phosphatase 1 regulatory subunit 13B* (ASPP1) inhibe l'apoptose en empêchant l'interaction entre LATS1 et YAP/TAZ (349). Dans un contexte oncogénique, ASPP1 transloque au noyau en réponse à la phosphorylation de LATS2. Dans le noyau, LATS2 et ASPP1 favorisent l'apoptose médiée par p53 (253).

2.5 Rôles de la voie Hippo dans la glande surrénale

Bien que l'importance de la voie Hippo soit bien établie dans le développement et l'homéostasie de plusieurs tissus, notamment le système nerveux (350), le système respiratoire (351-354), les muscles (355, 356), le cœur (322, 357, 358), le système gastro-intestinal (359), le foie (360), le pancréas (359, 361), les reins (362-364), la glande mammaire (365), les dents (366), le système reproducteur mâle (367, 368) et femelle (369) et de nombreux autres, le rôle de la voie Hippo dans la glande surrénale n'a pas beaucoup été étudié.

Dans une étude parue en 2017, la délétion conditionnelle de *Yap* et *Taz* dans les cellules stéroïdiennes (*Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1-cre*) a permis d'investiguer le rôle de la voie Hippo dans le cortex surrénalien post-natal. Chez la souris adulte normale, YAP est exprimé fortement dans le cytoplasme et le noyau des cellules de la zG, dans le noyau des cellules de la zF et dans les cellules endothéliales. TAZ démontre une expression nucléaire dans la zG, la zF, la capsule et les cellules endothéliales ainsi qu'une expression cytoplasmique dans la zX (femelles) (370). Les mâles *Yap^{flox/+};Taz^{flox/+};Nr5a1-cre* et *Yap^{flox/+};Taz^{flox/flox};Nr5a1-cre* présentaient un phénotype surrénalien normal d'un point de vue histologique tandis qu'on pouvait observer une atteinte corticale chez les mâles *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/+};Nr5a1-cre* et *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1-cre*, avec de nombreuses vacuoles et de larges structures lipoides multinucléées à 20 semaines d'âge ainsi qu'une atrophie et une dégénérescence sévère du cortex à 30 semaines d'âge. Les souris *Yap^{flox/flox};Nr5a1-cre* manifestaient des changements similaires mais beaucoup plus légers. Ces résultats démontrent que YAP joue un rôle prépondérant dans le maintien du cortex et qu'il y a une certaine redondance fonctionnelle entre YAP et TAZ. Le développement embryonnaire et la zonation du cortex ne semblaient pas affectés dans ce modèle.

Ensuite, il y avait une augmentation de l'apoptose dans les cellules adrénocorticales des mâles mutants *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1-cre*, expliquant en partie la dégénérescence. De plus, ces souris

démontraient une diminution de la corticostérone induite par l'ACTH à 10 semaines, une accumulation de lipides dans le cortex et une diminution de l'expression de gènes stéroïdogéniques. Ces résultats suggèrent que la capacité de stéroïdogénèse était diminuée, probablement à cause d'une perte de cellules adrénocorticales. De plus, la régénération du cortex était moins efficace chez les mutants après une suppression de la zF par la dexaméthasone. L'expression de *Shh*, de *Nr0b1* et de *Gli1* était diminuée et celle de *Dlk1* était augmentée. Il a donc été suggéré que la délétion de *Yap/Taz* affecte les cellules progénitrices par un mécanisme inconnu (370).

Le cortex surrénalien des femelles de tous les génotypes ne montrait pas d'anomalie morphologique, mais les femelles *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1-cre* présentaient une diminution de la capacité de stéroïdogénèse et de l'expression de *Shh*. Ces résultats mettent en évidence un dimorphisme sexuel important dans l'homéostasie du cortex, tel que discuté précédemment (370).

L'implication de la voie Hippo dans des tumeurs adrénocorticales pédiatriques humaines a également été étudiée en 2016 (371). Dans cette étude, il a été démontré que YAP est fortement exprimé dans le cortex surrénalien fœtal et plus faiblement dans le cortex post-natal. YAP était souvent surexprimé dans les tumeurs adrénocorticales et ainsi associé à un moins bon pronostic, avec une plus grande incidence de métastases et de récurrence ainsi qu'une survie diminuée. L'inhibition *in vitro* de la voie Wnt/ β -caténine dans une lignée de cellules NCI-H295 par un inhibiteur pharmacologique de la β -caténine (PNU-74654) a entraîné une diminution de l'expression de YAP, suggérant une interaction entre la voie Wnt et Hippo dans la surrénale (371).

Chapitre 2 – Hypothèse et objectif

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont permis de découvrir que la voie Hippo était essentielle au développement et à l'homéostasie de plusieurs organes chez les mammifères. Plus particulièrement, il a récemment été démontré que YAP et TAZ participaient au maintien du cortex surrénalien chez la souris adulte.

Dans ce projet, nous souhaitons nous pencher davantage sur la période embryonnaire. Notre hypothèse est donc que la voie Hippo est également requise pour le développement normal du cortex surrénalien, ce qui n'a jamais été étudié jusqu'à présent. L'objectif qui en découle est donc d'identifier le rôle physiologique des kinases LATS1 et LATS2 de la voie Hippo dans les cellules adrénocorticales pendant le développement de la glande surrénale l'aide d'un modèle *in vivo* de souris transgéniques.

Chapitre 3 – Article

Titre : Targeted disruption of *Lats1* and *Lats2* in mice impairs adrenal cortex development and alters adrenocortical cell fate

Amélie Ménard, Nour Abou Nader, Adrien Levasseur, Guillaume St-Jean, Marie Le Gad-Le Roy, Derek Boerboom, Marie-Odile Benoit-Biancamano, Alexandre Boyer

Contribution des auteurs : Dans le cadre de cette publication, j'ai rédigé l'article, réalisé la grande majorité des expériences présentées dans l'article, fait l'analyse des résultats et produit les figures. Nour Abou Nader a participé aux dissections de souris, a effectué quelques colorations immunohistochimiques et quelques RT-qPCR, et a récolté le plasma pour les dosages hormonaux (Figure S1). Adrien Levasseur a effectué l'immunofluorescence pour 20 α -HSD (Figure 1E et 1F). Guillaume Saint-Jean m'a appris la technique de dissection d'embryons. Marie Le Gad-Le Roy, sous ma supervision, a également participé aux dissections à quelques reprises. Marie-Odile Benoit-Biancamano a contribué à l'analyse histopathologique des tissus et a révisé le manuscrit. Derek Boerboom a contribué par ses recommandations, par son support matériel et il a révisé le manuscrit. Alexandre Boyer a supervisé le projet et corrigé le manuscrit.

Article publié dans la revue *Endocrinology* le 2 avril 2020. Référence : June 2020, 161(5). DOI : 10.1210/endocr/bqaa052

Targeted disruption of *Lats1* and *Lats2* in mice impairs adrenal cortex development and alters adrenocortical cell fate

Amélie Ménard¹, Nour Abou Nader¹, Adrien Levasseur¹, Guillaume St-Jean¹, Marie Le Gad-Le Roy¹, Derek Boerboom¹, Marie-Odile Benoit-Biancamano², Alexandre Boyer¹

¹ Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada J2S 7C6

² Département de Pathologie et Microbiologie Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada J2S 7C6

Short title: Role of *Lats1* and *Lats2* in adrenal gland development

Keywords: LATS1, LATS2, adrenocortical cells, development, adrenal gland

Address all correspondence and requests for reprints to:

Alexandre Boyer, Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada.

Phone: 1-450-773-8521 ex 8345, e-mail: alexandre.boyer.1@umontreal.ca

This work was supported by Discovery Grants RGPIN-2014-04358 (to AB) and a graduate scholarship (to AM) from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NESRC). The University of Virginia Center for Research in Reproduction Ligand Assay and Analysis Core is supported by the National Institutes of Health Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (Specialized Cooperative Centers Program in Reproduction and Infertility Research) Grant P50-HD28934.

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose

3.1 Abstract

It has recently been shown that the loss of the Hippo signaling effectors Yes-associated protein (YAP) and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) in adrenocortical steroidogenic cells impairs the postnatal maintenance of the adrenal gland. To further explore the role of Hippo signaling in mouse adrenocortical cells, we conditionally deleted the key Hippo kinases large tumor suppressor homolog kinases 1 and -2 (*Lats1* and *Lats2*, two kinases that antagonize YAP and TAZ transcriptional co-regulatory activity) in steroidogenic cells using an *Nr5a1*-cre strain (*Lats1*^{flox/flox};*Lats2*^{flox/flox};*Nr5a1*-cre). We report here that developing adrenocortical cells adopt characteristics of myofibroblasts in both male and female *Lats1*^{flox/flox};*Lats2*^{flox/flox};*Nr5a1*-cre mice, resulting in a loss of steroidogenic gene expression, adrenal failure and death by 2 to 3 weeks of age. A marked accumulation of YAP and TAZ in the nuclei of the myofibroblast-like cell population with an accompanying increase in the expression of their transcriptional target genes in the adrenal glands of *Lats1*^{flox/flox};*Lats2*^{flox/flox};*Nr5a1*-cre animals suggested that the myofibroblastic differentiation could be attributed in part to YAP and TAZ. Taken together, our results suggest that Hippo signaling is required to maintain proper adrenocortical cell differentiation and suppresses their differentiation into myofibroblast-like cells.

3.2 Introduction

In mice, the adrenal cortex is derived from the intermediate mesoderm and arises from the proliferation of coelomic epithelial cells. The latter initially form the adrenogonadal primordium (AGP) at embryonic day 9.5 (e9.5), a structure from which the gonads also develop (1, 2). Around e10.5, the AGP separates into two distinct tissues as the adrenal progenitor cells migrate dorsomedially to form the adrenal primordium (AP) at e11.0 (3, 4). Shortly after, at e12.5, chromaffin cells derived from the neural crest invade the AP to form the adrenal medulla (5, 6) while mesenchymal cells surrounding the developing adrenal gland start to condense to form its capsule (7). Development of the definitive adrenal cortex starts after encapsulation at e14.5, with zonation being first observed around e17.5. Adrenal cortex development is then completed after birth (7, 8). While the definitive cortex expands, the fetal zone decreases in size, and after birth forms the transient X-zone located in the innermost part of the cortex (9). Despite this two-step developmental process, lineage-tracing experiments have shown that both the fetal cortex and the definitive cortex derive from a common embryonic population of NR5A1-expressing cells (8, 10). Though numerous transcription factors (including GATA binding protein 4 and 6 (GATA4/6) (11), nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1 (NR5A1) (1, 12, 13) and Wilm's tumor 1 (WT1) (4) as well as signaling pathways such as Insulin/Insulin-like growth factor (14), WNT/beta-catenin (15),

Hedgehog (16) and protein kinase A (PKA) (17) are all known to be necessary for different stages of adrenal development and maintenance, additional pathways are likely involved.

Hippo is an evolutionarily conserved signaling pathway with well-established roles in cell fate determination, differentiation and proliferation during embryonic development (reviewed in (18, 19). It consists of a kinase cascade that regulates two functionally redundant transcriptional co-activators, Yes-associated protein (YAP) and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ). In response to various extracellular signals, the mammalian STE20-like protein kinases 1 and 2 (MST1, MST2) are activated and phosphorylate the large tumor suppressor homolog kinases 1 and 2 (LATS1, LATS2) which in turn phosphorylates YAP and TAZ. YAP and TAZ phosphorylation leads to their inactivation by sequestration in the cytoplasm and/or by proteasome-mediated degradation. When the cascade is inactivated, YAP and TAZ accumulate in the nucleus and interact with transcriptional factors to regulate the transcription of genes involved in cell growth, apoptosis, and proliferation (19, 20).

A role for Hippo signaling in the adrenal gland was first suggested in a study which showed that elevated YAP expression was associated with poor outcome of adrenocortical tumors in pediatric patients (21). More recently, using a genetic model, the concomitant loss of *Yap* and *Taz* in steroidogenic adrenocortical cells was shown to lead to the progressive degeneration of the adrenal cortex (22). In the present study, to further characterize the role of the Hippo signaling pathway in adrenal cortex development and maintenance, we generated a mouse model in which *Lats1* and/or *Lats2* were conditionally deleted in NR5A1-positive steroidogenic cells.

3.3 Material and Methods

Ethics

All animal procedures were approved by the Comité d'Éthique de l'Utilisation des Animaux of the Université de Montréal (protocol numbers Rech-1739 and Rech-1909) and conformed to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Transgenic mouse strains

Nr5a1-cre mice (FVB-Tg-*Nr5a1*^{Cre7Low/J}, RRID:IMSR_JAX:012462) were obtained from the Jackson Laboratory and maintained by crossing *Cre*-positive males with wild-type females (C57BL/6J, RRID:IMSR_JAX:000664). *Lats1*^{flox/flox} (*Lats1*^{tm1.1JFm/RjoJ}, RRID:MGI:5568587) and *Lats2*^{flox/flox} (*Lats2*^{tm1.1JFm/RjoJ}, RRID:MGI:5568590) mice were obtained from Dr Randy L. Johnson (M.D. Anderson Cancer Center,

Houston, TX). Mice were selectively bred over several generations to obtain *Lats1^{flox/flox};Nr5a1-cre*, *Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* and *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* genotypes. Genotype analyses were done on tail biopsies by PCR as previously described for Cre (23) and *Lats1/2* (24).

Histopathology, immunohistochemistry and immunofluorescence

Whole embryos or isolated adrenal glands for light microscopy histopathologic analysis were fixed in 4% paraformaldehyde for 4 hours (whole embryos, 1 day post partum (dpp) adrenals) or in formalin overnight (adrenals from 2 week-old mice). Tissues were embedded in paraffin, sectioned (5 μ m), and stained with hematoxylin and eosin stain (H&E). Immunohistochemistry was done on formalin-fixed, paraffin-embedded, 5 μ m-thick tissue sections using VectaStain Elite avidin–biotin complex method kits (Vector Laboratories) or the mouse on mouse (M.O.M.) elite peroxidase kit (Vector Laboratories) as directed by the manufacturer. Sections were probed with primary antibodies against bromodeoxyuridine (BrdU) [1:100, Dako corp (25)], cleaved caspase-3 (CAS3) [1:100, Cell signalling (26)], cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 1 (CYP11B1) [1:200 (27)], alpha smooth muscle actin (α -SMA) [1:100, BioGenex (28)], steroid acute regulatory protein (STAR) [1:200, Santa Cruz biotech (29)], TAZ [1:500, Sigmal-Aldrich (30)], tyrosine hydroxylase (TH) [1:200, Santa Cruz biotech (31)], YAP [1:100, Cell signaling (32)], phospho-YAP [1:100, Cell signaling (33)] and vimentin [1:100, Cell signalling (34)]. Staining was done using the 3,3'-diaminobenzidine peroxidase substrate kit (Vector Laboratories). Immunofluorescence was done on formalin-fixed, paraffin-embedded, 5 μ m-thick tissue sections. Sections were probed with a primary antibody for 20-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (20 α HSD) [1:2500, a gift from F. Beuschlein (35)]. Staining was performed using ImmPress polymer (Vector Laboratories) followed by the Alexa Fluor 555 Tyramide superboost kit (ThermoFisher scientific) and counterstaining with DAPI vectashield (Vector Laboratories). Negative controls consisted of slides for which the primary antibody was omitted.

Hormone measurements

Blood samples for plasma collection were collected between 9:30 and 10:00 in 2K-EDTA microvette tubes (Sarstedt) and centrifuged at 2000g for 15 minutes at 4 °C. Plasma samples were transferred to polypropylene tubes and stored at -80 °C until analysis. ACTH levels in the plasma were determined by immulite 2000 (Siemens Healthineers Global). Corticosterone levels were determined by RIA (MP Biomedical). Assays were performed by the Center for Research in Reproduction at the Ligand Assay and Analysis Core Laboratory of the University of Virginia.

Reverse transcription-quantitative PCR

Total RNA from adrenal glands of e14.5, e17.5 and 1 day-old animals was extracted using the Total RNA Mini Kit (FroggaBio) according to the manufacturer's protocol. Total RNA was reverse transcribed using 100 ng of RNA and the SuperScriptVilo™ cDNA synthesis kit (Thermo Fisher scientific). Real-time PCR reactions were run on a CFX96 Touch instrument (Bio-Rad), using Supergreen Advanced qPCR MasterMix (Wisent, St-Bruno, Canada). Each PCR reaction consisted of 7.5 µl of Power SYBR Green PCR Master Mix, 2.3 µl of water, 4 µl of cDNA sample and 0.6 µl (400 nmol) of gene-specific primers. PCR reactions run without complementary cDNA (water blank) served as negative controls. A common thermal cycling program (3 min at 95°C, 40 cycles of 15s at 95°C, 30 s at 60°C and 30 s at 72°C) was used to amplify each transcript. To quantify relative gene expression, the Ct of genes of interest was compared with that of *Rpl19*, according to the ratio $R = [E^{Ct_{Rpl19}}/E^{Ct_{target}}]$ where E is the amplification efficiency for each primer pair. *Rpl19* Ct values did not change significantly between tissues, and *Rpl19* was therefore deemed suitable as an internal reference gene. The specific primer sequences used are listed in reference 36.

BrdU incorporation assay

Pregnant mice were injected intraperitoneally at gestational day 17.5 with 100 mg/kg body weight BrdU (Sigma-Aldrich) and euthanized 4 hours after the injection. The embryos were collected, fixed in 4% PFA for 4 hours and embedded in paraffin. The BrdU-labeled DNA was detected by immunohistochemistry as described above.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed with Prism software version 6.0d (GraphPad Software Inc., RRID: SCR_002798). All the data sets were subjected to the *F* test to determine the equality of variances. Student's t-test was used for all comparisons between genotypes except for ACTH results for which a Mann-Whitney test was used because of the variance between samples. Means were considered significantly different when *P* value was < 0.05. All data are presented as means ± SEM.

3.4 Results

Loss of *Lats1* and *Lats2* causes loss of adrenocortical cell identity

To investigate the role of LATS1 and LATS2 in the adrenal cortex, mice bearing floxed alleles for *Lats1* and/or *Lats2* were crossed with the *Nr5a1-cre* strain, which targets steroidogenic cells including those of the fetal and of the definitive adrenal cortex. *Lats1*^{flox/flox}; *Nr5a1-cre* and *Lats2*^{flox/flox}; *Nr5a1-cre*

mice had adrenal glands that appeared normal at the gross and histologic levels (data not shown) and a normal lifespan, and for these reasons were not further studied. Conversely, *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice died between 2 and 3 weeks of age, most likely from adrenocortical failure, as suggested by a marked decrease in circulating corticosterone levels (below the assay detection threshold in the mutant animals) and a concomitant increase in circulating ACTH levels in 10 to 12 day-old mutant mice of both genders (36). Adrenal glands from 2 week-old *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* males (Fig. 1A, B) were larger ($P < 0.01$), more irregular and paler than the adrenal glands from the control *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox}* animals, whereas adrenal glands from 2 week-old mutant females tended to be larger ($P = 0.09$) (Fig. 1B). Histopathologic analyses (Fig. 1C, D; Fig. S2) revealed striking abnormalities in the adrenals of both male (Fig. 1D) and female (36) mutant mice. First, zonation of the adrenal cortex was not apparent in the mutant animals, and the majority of the presumptive adrenocortical cells adopted a spindle shape, with less cytoplasm and smaller, elongated nuclei reminiscent of fibroblasts or myofibroblasts (Fig. 1D). Interspersed among these spindle-shaped cells, a less abundant cell population featuring large nuclei with an eosinophilic cytoplasm (Fig 1D, arrowheads) and a rare cell population featuring a pale cytoplasm containing lipid droplets typical of steroidogenic cells were also observed (Fig. 1D, arrows). Furthermore, 20α -HSD-positive cells (Fig. 1E, F) were not detected in the adrenal glands of the mutant animals (Fig. 1F), indicating that the X-zone was absent. These results suggest that both the fetal and the definitive adrenal cortex were altered during development.

Finally, cortex-medulla disorganization was also apparent in the adrenal glands of the *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* animals, as only a few tyrosine hydroxylase (TH)-positive medullary chromaffin cells were identified, scattered haphazardly within the adrenal gland (Fig. 1H). Larger masses of medullary cells were also often found located at the periphery of the adrenal glands (Fig. 1H). These observations also suggest that the formation of the medulla was altered during development.

LATS1 and LATS2 are required for the normal development of the adrenal gland

To analyse the onset and evolution of the phenotype observed in *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice, efficiency of the recombination in the developing adrenal gland was evaluated by RT-qPCR at embryonic days e14.5, e17.5 and 1 day post-partum (dpp). RT-qPCR analyses showed a small but significant reduction (23%) of adrenal *Lats1* mRNA levels in e14.5 mutant animals (Fig. 2A), 68% and 36% decreases in adrenal *Lats1* and *Lats2* mRNA levels in e17.5 mutant animals (Fig. 2B), and 80% and 62% decreases in adrenal *Lats1* and *Lats2* mRNA levels in 1dpp mutant animals (Fig. 2C). These results suggest

that the loss of *Lats1* and *Lats2* was progressive within the adrenal cortex and that recombination is initiated shortly before e14.5.

Consistent with the kinetics of the loss of *Lats1/2* expression, adrenal glands from e14.5 and e15.5 *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice appeared phenotypically indistinguishable from age-matched controls (Fig. 3) including presence of medullary cells located at the center of the adrenal gland. By e17.5 forward, the adrenal cortex was severely compromised, and no zonation was apparent (Fig. 3). Cells with a large nucleus and an eosinophilic cytoplasm and spindle-shaped cells were observed in the adrenal cortex (Fig. 3, S3A-C (31)), as observed in the 2 week-old animals. However, the spindle-shaped cells were less abundant than in the 2 week-old animals. Also similar to what was observed in 2 week-old animals, medullary cells were less abundant, and some medullary cells were observed at the periphery of the adrenal gland (36).

To characterize the mutant adrenocortical cells, apoptosis and proliferation were evaluated in the developing adrenal gland. Interestingly, no apoptotic cells were observed in the adrenal glands of either control or mutant animals at e14.5 (36) and very rare cells were observed in the adrenal glands of either control or mutant animals at e17.5 (36). BrdU incorporation assays showed that, in control e17.5 mice, only a few adrenocortical cells were proliferating in the outer cortex, and medullary cells were also proliferating (36). In contrast, proliferative cells were more scattered throughout the cortex in the adrenal glands of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice, and most of the proliferating cells had round nuclei, whereas the spindled-shaped cells were mostly non-proliferative. Together, the absence of an increase in apoptosis and the absence of proliferation of the spindled-shaped cells suggested that the adrenocortical cells had transdifferentiated into the spindled-shaped cells.

To further evaluate the fate of the adrenocortical cells in the developing adrenal glands of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice, steroidogenic activity was evaluated by CYP11B1 and STAR immunohistochemistry. At e14.5, the expression of CYP11B1 expression was indistinguishable between control and mutant animals (Fig. 4). At e15.5, the number of CYP11B1+ cells was already considerably reduced (Fig. 4) in the adrenal cortex of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice, despite being morphologically similar to the adrenal cortex of control animals (Fig. 3). By e17.5, expression of CYP11B1 was only detected in a few cells scattered throughout the adrenal cortex of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice (Fig 4). Similar to what was observed for CYP11B1, a progressive decrease in STAR+ cells was observed in the adrenal cortex of the *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice. However, this decrease was delayed compared to CYP11B1, as a large proportion of adrenocortical cells still expressed STAR at e17.5

(Fig. 5), and most STAR expression was then gone by 1dpp. These differences in the expression patterns of *Cyp11b1* and *Star* were also observed by RT-qPCR (36). Furthermore, mRNA levels of every steroidogenic genes evaluated were also progressively and severely reduced in the adrenal gland of mutant animals (36). Taken together, these results suggest that the loss of differentiated cell function accompanies the loss of differentiated cell morphology.

Loss of Hippo signaling causes adrenocortical cells to commit to a myofibroblast-like cell fate.

As mentioned above, the spindle-shaped cells observed in the adrenal cortex of the mutant animals were reminiscent of fibroblasts or myofibroblasts. To determine the identity of these cells, adrenal glands of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* were first analyzed for expression of the mesenchymal cell marker vimentin (31). Vimentin was detected in the capsular cells in both control and mutant animals throughout development (Fig. 6). At e14.5, expression of vimentin was similar between the control and the mutant animals, and was predominantly expressed in the medullary cell population at the center of the adrenal gland, with weak expression detected in a few adrenocortical cells and in endothelial cells (Fig. 6). A similar pattern was observed at e15.5, however, a few spindle-shaped cells (Fig. 6, arrow) in the adrenal cortex of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice also appeared to express vimentin more strongly (Fig. 6). By e17.5, vimentin expression was still detected in scattered adrenocortical cells, as well as in vascular and connective tissues in control animals. However, a marked increase in vimentin expression was observed in the adrenal cortex of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice (Fig. 6).

To determine if the cells present in the adrenal cortex of the mutant animals further differentiated into myofibroblasts, alpha smooth muscle actin (α -SMA) expression was evaluated by immunohistochemistry. α -SMA was not detected in the adrenal cortex of control animals (Fig. 7). Conversely, in the adrenal gland of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice, α -SMA expression was detected in an increasing number of adrenocortical cells, beginning in the subcapsular region at e17.5 (Fig. 7), followed by the center of the adrenal gland in 1 day and 2 week-old animals (Fig. 7). This suggests that some cells of the adrenal cortex progressively differentiate into myofibroblast-like cells. Furthermore, an increase in the mRNA levels of actin, alpha 2, smooth muscle, aorta (*Acta2*, the gene coding for α -SMA) and of the fibrosis/myofibroblast markers caldesmon 1 (*Cald1*), calponin 1, basic, smooth muscle (*Cnn1*), snail family zinc finger 1 (*Snai1*) and secreted phosphoprotein 1 (*Spp1*) (36) was observed in the adrenal gland of mutant animals. Finally, an accumulation of collagen fibers in the adrenal cortex of mutant animals (36) further confirmed that some adrenocortical cells of the mutant mice acquired features of myofibroblasts, leading to tissue fibrosis. Interestingly, the number of α -SMA-positive cells was more

restricted than the pattern of expression of vimentin-positive cells, even in older animals, suggesting either that some fibroblast-like cells remained undifferentiated or differentiated into additional cell types.

Loss of *Lats1* and *Lats2* causes an increase in the expression of YAP and TAZ downstream transcriptional targets

To determine whether the loss of *Lats1* and *Lats2* lead to the inactivation of Hippo signaling in the adrenal glands of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice, the phosphorylation of YAP (a main LATS1/2 kinase substrate) was first evaluated by immunohistochemistry. Phospho-YAP was readily detected in the adrenal cortex of control animals at e17.5, with the subcapsular region showing the strongest expression (Fig. 8A). However, phospho-YAP expression was only detected in a few cells in the adrenal cortex of the mutant animals (Fig. 8B), confirming Hippo signaling inactivation. Because the phosphorylation of YAP (and of the functionally redundant TAZ) is normally associated with a decrease in their transcriptional co-activator activity, mRNA levels of the well-established YAP/TAZ target genes Baculoviral IAP repeat containing 5 (*Birc5*), connective tissue growth factor (*Ctgf*), cysteine-rich, angiogenic inducer 61 (*Cyr61*) and nephroblastoma overexpressed (*Nov*) were quantified by RT-qPCR. A two-fold, three-fold and 15-fold increase was respectively observed for *Birc5*, *Ctgf* and *Cyr61* in the adrenal cortex of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice at e17.5, whereas expression of *Nov* was not modified at this age (Fig. 8C). Conversely, only the expression of *Ctgf* was strongly increased (12-fold) in the adrenals of newborn mutant animals, and a slight decrease in the expression of *Nov* was observed (Fig. 8D), confirming that Hippo signaling was inactivated in the adrenal gland of the mutant animals.

To further characterize the expression pattern of YAP and TAZ in the adrenal gland of the mutant animals, immunohistochemistry analyses for YAP and TAZ were also performed on adrenal glands from e17.5 and 1dpp male mice. At both time points, strong YAP expression was detected in the nuclei of capsular and adrenocortical cells of the control animals (36). Strong expression of YAP was also detected in the nuclei of mesenchymal cells present in the adrenal cortex of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* animals (36) at both time points. TAZ was also detected in the nucleus of the capsular cells of the control animals (36). TAZ was detected in the nuclei of adrenocortical cells of control mice at 1dpp (36), but was mostly expressed in the cytoplasm of the adrenocortical cells at e17.5, with the strongest expression being detected in the subcapsular region of the adrenal cortex at e17.5 (36). In the mutant group, strong cytoplasmic and weak nuclear expression of TAZ was detected in the majority of the adrenocortical cells at e17.5 (36). However, by 1dpp, strong nuclear expression of TAZ was also detected in the nuclei of the majority of the adrenocortical cells (36).

Taken together, these data suggest that YAP/TAZ transcriptional co-regulatory activity is increased in the adrenal cortex of *Lats1*^{flox/flox};*Lats2*^{flox/flox};*Nr5a1*-cre mice and could be involved in the transdifferentiation of adrenocortical cells into myofibroblast-like cells.

3.5 Discussion

In recent years, Hippo signaling has been identified as one of the most important signaling pathways involved in tissue development, however, no study has evaluated its function in the development of the adrenal cortex. Here we report that the inactivation of *Lats1* and *Lats2*, the two core kinases of the Hippo pathway, leads to the transdifferentiation of adrenocortical cells into myofibroblast-like cells.

Two events could potentially explain the differentiation of the adrenocortical cells into myofibroblast-like cells in the adrenal cortex of the *Lats1*^{flox/flox};*Lats2*^{flox/flox};*Nr5a1*-cre mice. First, due to the rapid appearance of the spindle-shaped cells, it seems likely that the steroidogenic cells of the adrenal cortex progressively transdifferentiated into the myofibroblast-like cells. The fact that a marked increase in vimentin expression was first observed at a time when STAR but not CYP11B1 was still expressed in numerous cells tends to favor this hypothesis. Interestingly, an increase in the mRNA levels of *Snai1*, a gene involved in fibrosis and the adoption of the myofibroblast cell fate (37-39) was also observed in the adrenal gland of mutant animals. Increases in vimentin (40) and *Snai1* (37, 41) expression are hallmarks of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT); a process by which polarized epithelial cells gain mesenchymal properties (42), and that can eventually lead to differentiation into myofibroblasts and fibrosis in late stages of pathological conditions (43-46). Interestingly, the adrenal cortex shares common characteristics with epithelia and expresses numerous epithelial markers such as cytokeratins, laminin I, collagen IV and laminin-associated integrin subunits (47-50). The increases in vimentin and in the mRNA levels of *Snai1* suggest that the loss of Hippo signaling could induce the transdifferentiation of the adrenocortical cells and subsequent fibrosis by a process having similitudes to EMT. Interestingly, it was recently suggested that EMT-like processes including increased in vimentin and *Snai1* expression could be determinants of the malignancy of adrenocortical carcinoma (51, 52) and childhood-onset adrenocortical tumors (52). Furthermore, suppression of Hippo signaling and increased YAP/TAZ activity play a role in EMT/metastasis of some tumor cells (53, 54), regulate *Snai1* expression (55, 56), and are a hallmark of fibrosis in several tissues including the liver (57), the lung (58), the kidney (59, 60), the heart (61) and the Müllerian duct (62). The transdifferentiation of the adrenocortical cells in the *Lats1*^{flox/flox};*Lats2*^{flox/flox};*Nr5a1*-cre model could therefore share certain characteristics of these processes.

A second possibility that could explain the phenotype observed in *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice is that Hippo signaling could normally direct a subset of mesenchymal stem cells (migrating from the capsule to form the definitive cortex) towards a steroidogenic cell fate (63, 64), and that the loss of *Lats1* and *Lats2* interferes with this process. Interestingly, in the developing kidney, it was shown that the loss of *Lats1* and *Lats2* in mesenchymal progenitor cells impairs their differentiation into cells of the nephron and induces their differentiation into myofibroblasts (60), suggesting that loss of *Lats1* and *Lats2* could also impair the differentiation of adrenal stem cells during adrenal development. The fact that α -SMA expression is first specifically detected in the subcapsular region rather than being randomly distributed in the adrenal cortex also suggest that improper differentiation of the mesenchymal stem cells could be involved in the development of the phenotype observed in the *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice. Our model does not permit us to distinguish between these two possibilities, and lineage tracing experiments (63, 64) for adrenal cells and capsular stem cells within the *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* model would be needed to distinguish between them. However, it seems likely that both processes are involved in the appearance of the myofibroblast-like cells in the adrenal cortex.

As mentioned above, an increase in YAP and TAZ activity has been associated with fibrosis in numerous tissues. It therefore seems likely that an increase in their activity is involved in the transdifferentiation of the adrenocortical cells. Aside from the increase in vimentin and the mRNA levels of *Snai1*, an increase in the mRNA levels of well-established transcriptional target of YAP and TAZ (65-67) was also observed in the adrenal glands of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice. Interestingly, *Cyr61* mRNA levels were increased in e17.5 animals, but this increase was not maintained in 1dpp animals. On the other hand, *Ctgf* mRNA levels continued to be upregulated in 1dpp animals. This suggests that a different set of genes could be regulated by YAP/TAZ depending of the stage of differentiation of the adrenocortical cells. Interestingly, it was previously shown that CYR61 promotes EMT in various tumors (68, 69), and that mRNA levels of *Cyr61* increase in profibrogenic liver cells, but decline in transdifferentiated myofibroblasts (70). It was also shown that CYR61 promotes the regression of fibrosis by inducing the senescence of myofibroblasts in the liver and the heart (70-72), suggesting that CYR61 is detrimental for myofibroblast formation. On the other hand, CTGF, which remain strongly expressed in the adrenocortical cells, has been previously described as a key driver of fibrosis (73, 74) and myofibroblast formation (75, 76), suggesting that CTGF could drive the last stage of the adrenocortical cell differentiation. The mechanism whereby Hippo signaling regulates the transition from adrenocortical cells to myofibroblast cells was not evaluated in this study. However, Hippo is known to act in synergy with numerous signaling pathways, including the TGF β (77-79) and WNT (21, 79-81) pathways, both of which

can also regulate *Ctgf* expression (73, 74, 82-86). It is therefore possible that activation/modulation of the TGF β and/or WNT pathways is involved in the progressive differentiation of the adrenocortical cells in the *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* model. Further experiments will be needed to evaluate the contribution of these pathways. Finally, though we believe that YAP/TAZ is the main driving force behind the observed phenotype, it is important to mention that it was recently shown that LATS1 and LATS2 could bind to other proteins such as estrogen receptor alpha (87) or polycomb repressive complex 2 (88) and act independently of Hippo signaling. It is therefore possible that actions of LATS1/2 on proteins other than YAP/TAZ could also contribute to the observed phenotype. Generation of a *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1-cre* mouse model will be needed to determine if YAP and TAZ stabilization is solely responsible for the observed phenotype.

Another finding in the *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* model was that fewer chromaffin cells were present in the adrenal gland, and that they were either scattered throughout the cortex or localized to the periphery of the adrenal gland. Loss of medullary cell growth (89, 90) and their ectopic localization outside of the capsule (16, 91-94) have previously been observed in different genetic mouse models with adrenal cortex development defects, leading several authors to propose that the adrenal cortex is essential for the growth of the medullary cells and their correct localization at the center of the adrenal gland (95, 96). The ectopic positioning of the medullary cells in the *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* model and the absence of proliferation of the medullary cells that were able to migrate to the center of the adrenal gland suggests that the transdifferentiated adrenocortical cells are either unable to secrete factors necessary for the migration and/or growth of the medullary cells or, more likely, do not provide the proper structural support for their development.

In summary, we report here a previously unsuspected role of the Hippo pathway in the development of the adrenal cortex, as loss of *Lats1/2* causes the developing adrenocortical cells to commit to a myofibroblast-like cell fate. Further studies will be required to define the mechanism of action of Hippo signaling throughout the development of the adrenal gland and its potential role in adrenal gland physiology.

3.6 Acknowledgements

The authors would like to thank Manon Salvat for technical assistance, Dr Celso Gomez-Sanchez (University of Mississippi, Medical Center, Jackson, MS) for generously providing the CYP11B1 antibody, Dr Randy L. Johnson (M.D. Anderson Cancer Center, Houston Tx) for generously providing the *Lats1/2* floxed

mice and mice and Dr Antoine Martinez (Université Clermont-Auvergne, Clermont-Ferrand, France) for letting Adrien Levasseur carry out the immunofluorescence for 20 β HSD in his laboratory.

3.7 Data availability

All data generated during this study are included in this article or in the data repositories listed in references.

3.8 References

1. Hatano O, Takakusu A, Nomura M, Morohashi K. Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Genes Cells*. 1996;1(7):663-71.
2. Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol*. 1994;8(5):654-62.
3. Morohashi K. The ontogenesis of the steroidogenic tissues. *Genes Cells*. 1997;2(2):95-106.
4. Val P, Martinez-Barbera JP, Swain A. Adrenal development is initiated by Cited2 and Wt1 through modulation of Sf-1 dosage. *Development*. 2007;134(12):2349-58.
5. Anderson DJ, Axel R. A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. *Cell*. 1986;47(6):1079-90.
6. Le Douarin NM, Teillet MA. Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neurectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. *Dev Biol*. 1974;41(1):162-84.
7. Keegan CE, Hammer GD. Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13(5):200-8.
8. Zubair M, Parker KL, Morohashi K. Developmental links between the fetal and adult zones of the adrenal cortex revealed by lineage tracing. *Mol Cell Biol*. 2008;28(23):7030-40.
9. Morohashi K, Zubair M. The fetal and adult adrenal cortex. *Molecular and cellular endocrinology*. 2011;336(1-2):193-7.
10. Zubair M, Ishihara S, Oka S, Okumura K, Morohashi K. Two-step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development: initiation by a Hox-Pbx1-Prep1 complex and maintenance via autoregulation by Ad4BP/SF-1. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(11):4111-21.
11. Tevosian SG, Jimenez E, Hatch HM, Jiang T, Morse DA, Fox SC, Padua MB. Adrenal Development in Mice Requires GATA4 and GATA6 Transcription Factors. *Endocrinology*. 2015;156(7):2503-17.
12. Luo X, Ikeda Y, Lala DS, Baity LA, Meade JC, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor plays essential roles in adrenal and gonadal development. *Endocr Res*. 1995;21(1-2):517-24.
13. Sadovsky Y, Crawford PA, Woodson KG, Polish JA, Clements MA, Tourtellotte LM, Simburger K, Milbrandt J. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(24):10939-43.
14. Pitetti JL, Calvel P, Romero Y, Conne B, Truong V, Papaioannou MD, Schaad O, Docquier M, Herrera PL, Wilhem D, Nef S. Insulin and IGF1 receptors are essential for XX and XY gonadal differentiation and adrenal development in mice. *PLoS Genet*. 2013;9(1):e1003160.
15. Kim AC, Reuter AL, Zubair M, Else T, Serecky K, Bingham NC, Lavery GG, Parker KL, Hammer GD. Targeted disruption of beta-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. *Development*. 2008;135(15):2593-602.

16. King P, Paul A, Laufer E. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(50):21185-90.
17. Dumontet T, Sahut-Barnola I, Septier A, Montanier N, Plotton I, Roucher-Boulez F, et al. PKA signaling drives reticularis differentiation and sexually dimorphic adrenal cortex renewal. *JCI Insight*. 2018;3(2).
18. Maugeri-Sacca M, De Maria R. The Hippo pathway in normal development and cancer. *Pharmacol Ther*. 2018;186:60-72.
19. Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev*. 2014;94(4):1287-312.
20. Varelas X. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development*. 2014;141(8):1614-26.
21. Abduch RH, Carolina Bueno A, Leal LF, Cavalcanti MM, Gomes DC, Brandalise SR, Masterrallo MJ, Yunes JA, Martinelli CE Jr, Tone LG, Tucci S, Molina CA, Ramalho FS, Moreira AC, Cardinalli IA, Scrideli CA, Ramalho LN, de Castro M, Antonini SR. Unraveling the expression of the oncogene YAP1, a Wnt/beta-catenin target, in adrenocortical tumors and its association with poor outcome in pediatric patients. *Oncotarget*. 2016;7(51):84634-44.
22. Levasseur A, St-Jean G, Paquet M, Boerboom D, Boyer A. Targeted Disruption of YAP and TAZ Impairs the Maintenance of the Adrenal Cortex. *Endocrinology*. 2017;158(11):3738-53.
23. Dhillon H, Zigman JM, Ye C, Lee CE, McGovern RA, Tang V, et al. Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron*. 2006;49(2):191-203.
24. Heallen T, Zhang M, Wang J, Bonilla-Claudio M, Klysik E, Johnson RL, Martin JF. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science*. 2011;332(6028):458-61.
25. RRID : AB_10013660, https://scicrunch.org/resolver/RRID:AB_10013660
26. RRID : AB_234188, https://antibodyregistry.org/search.php?q=AB_234188
27. RRID : AB_2687896, https://scicrunch.org/resolver/RRID:AB_2687896
28. RRID : AB_2335623, https://scicrunch.org/resolver/RRID:AB_2335623
29. RRID : AB_2115937, https://scicrunch.org/resolver/RRID:AB_2115937
30. RRID : AB_1080602, https://scicrunch.org/resolver/RRID:AB_1080602
31. RRID : AB_671397, https://scicrunch.org/resolver/RRID:AB_671397
32. RRID : AB_2650491, https://scicrunch.org/resolver/RRID:AB_2650491
33. RRID : AB_2650553, https://scicrunch.org/resolver/AB_2650553
34. RRID : AB_10695149, https://scicrunch.org/resolver/RRID:AB_10695149
35. Hershkovitz L, Beuschlein F, Klammer S, Krup M, Weinstein Y. Adrenal 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the mouse catabolizes progesterone and 11-deoxycorticosterone and is restricted to the X-zone. *Endocrinology*. 2007;148(3):976-88.
36. Ménard M, Abou Nader N, Levasseur A, St-Jean G, Le Gad-Le Roy M, Boerboom D, Marie-Benoit-Biancamano MO, Boyer A. Data from: Targeted disruption of *Lats1* and *Lats2* in mice impairs adrenal cortex development and alters adrenocortical cell fate. Scholars Portal Dataverse. Deposited 23 March 2020.

<https://dataverse.scholarsportal.info/privateurl.xhtml?token=5be3d55e-1fca-4afd-8c01-315069917fb3>

37. Grande MT, Sanchez-Laorden B, Lopez-Blau C, De Frutos CA, Boutet A, Arevalo M, Rowe RG, Weiss SJ, Lopez-Novoa JM, Nieto MA. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat Med* 2015; 21:989-997
38. Biswas H, Longmore GD. Action of SNAIL1 in Cardiac Myofibroblasts Is Important for Cardiac Fibrosis following Hypoxic Injury. *PLoS One* 2016; 11:e0162636
39. Scarpa M, Grillo AR, Brun P, Macchi V, Stefani A, Signori S, Buda A, Fabris P, Giordani MT, De Caro R, Palu G, Castagliuolo I, Martines D. Snail1 transcription factor is a critical mediator of hepatic stellate cell activation following hepatic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300:G316-326
40. Battaglia RA, Delic S, Herrmann H, Snider NT. Vimentin on the move: new developments in cell migration. *F1000Res*. 2018;7.
41. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 2013; 13:963-972
42. Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene*. 2008;27(55):6958-69.
43. Masszi A, Speight P, Charbonney E, Lodyga M, Nakano H, Szaszi K, Kapus A. Fate-determining mechanisms in epithelial-myofibroblast transition: major inhibitory role for Smad3. *J Cell Biol*. 2010;188(3):383-99.
44. Yeung KT, Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. *Mol Oncol*. 2017;11(1):28-39.
45. Stone RC, Pastar I, Ojeh N, Chen V, Liu S, Garzon KI, Tomic-Canic M. Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res*. 2016;365(3):495-506.
46. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest*. 2002;110(3):341-50.
47. Campbell S, Otis M, Cote M, Gallo-Payet N, Payet MD. Connection between integrins and cell activation in rat adrenal glomerulosa cells: a role for Arg-Gly-Asp peptide in the activation of the p42/p44(mapk) pathway and intracellular calcium. *Endocrinology* 2003; 144:1486-1495
48. Otis M, Campbell S, Payet MD, Gallo-Payet N. Expression of extracellular matrix proteins and integrins in rat adrenal gland: importance for ACTH-associated functions. *J Endocrinol* 2007; 193:331-347
49. Virtanen I, Korhonen M, Petajaniemi N, Karhunen T, Thornell LE, Sorokin LM, Konttinen YT. Laminin isoforms in fetal and adult human adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4960-4966
50. Miettinen M, Lehto VP, Virtanen I. Immunofluorescence microscopic evaluation of the intermediate filament expression of the adrenal cortex and medulla and their tumors. *Am J Pathol* 1985; 118:360-366
51. Agosta C, Laugier J, Guyon L, Denis J, Bertherat J, Libe R, Boisson B, Sturm N, Feige JJ, Chabre O, Cherradi N. MiR-483-5p and miR-139-5p promote aggressiveness by targeting N-myc downstream-regulated gene family members in adrenocortical cancer. *Int J Cancer* 2018; 143:944-957
52. Bulzico D, Faria PAS, Maia CB, de Paula MP, Torres DC, Ferreira GM, Pires BRB, Hassan R, Abdelhay E, Vaisman M, Vieira Neto L. Is there a role for epithelial-mesenchymal transition in adrenocortical tumors? *Endocrine* 2017; 58:276-288
53. Xiao H, Jiang N, Zhou B, Liu Q, Du C. TAZ regulates cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2015; 106:151-159

54. Oh SH, Swiderska-Syn M, Jewell ML, Premont RT, Diehl AM. Liver regeneration requires Yap1-TGFbeta-dependent epithelial-mesenchymal transition in hepatocytes. *J Hepatol* 2018; 69:359-367
55. Lu J, Yang Y, Guo G, Liu Y, Zhang Z, Dong S, Nan Y, Zhao Z, Zhong Y, Huang Q. IKBKE regulates cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition of human malignant glioma via the Hippo pathway. *Oncotarget*. 2017;8(30):49502-14.
56. Zhaojie L, Yuchen L, Miao C, Yacun C, Shayi W, Anbang H, Xinhui L, Meng Z, Peipei W, Hongbin M, Feng W, Zhiming C, Xinyuan G. Gelsolin-like actin-capping protein has prognostic value and promotes tumorigenesis and epithelial-mesenchymal transition via the Hippo signaling pathway in human bladder cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2019;11:1758835919841235.
57. Mannaerts I, Leite SB, Verhulst S, Claerhout S, Eysackers N, Thoen LF, Hoorens A, Reynaert H, Halder G, van Grunsven LA. The Hippo pathway effector YAP controls mouse hepatic stellate cell activation. *J Hepatol*. 2015;63(3):679-88.
58. Zhao X, Sun J, Su W, Shan H, Zhang B, Wang Y, Shabanova A, Shan H, Liang H. Melatonin Protects against Lung Fibrosis by Regulating the Hippo/YAP Pathway. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4).
59. Liu F, Lagares D, Choi KM, Stopfer L, Marinkovic A, Vrbanac V, Probst CK, Hiemer SE, Sisson TH, Horowitz JC, Rosas IO, Fredenburgh LE. Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;308(4):L344-57.
60. McNeill H, Reginensi A. Lats1/2 Regulate Yap/Taz to Control Nephron Progenitor Epithelialization and Inhibit Myofibroblast Formation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2017;28(3):852-61.
61. Xiao Y, Hill MC, Li L, Deshmukh V, Martin TJ, Wang J, Martin JF. Hippo pathway deletion in adult resting cardiac fibroblasts initiates a cell state transition with spontaneous and self-sustaining fibrosis. *Genes Dev* 2019;33(21-22) :1491-1505.
62. St-Jean G, Tsoi M, Abedini A, Levasseur A, Rico C, Morin M, Djordjevic B, Miinalainen I, Kaarteenaho R, Paquet M, Gevry N, Boyer A, Vanderhyden B, Boerboom D. Lats1 and Lats2 are required for the maintenance of multipotency in the Mullerian duct mesenchyme. *Development* 2019;146(20).
63. Wood MA, Acharya A, Finco I, Swonger JM, Elston MJ, Tallquist MD, et al. Fetal adrenal capsular cells serve as progenitor cells for steroidogenic and stromal adrenocortical cell lineages in *M. musculus*. *Development* (Cambridge, England). 2013;140(22):4522-32.
64. Bandiera R, Vidal VP, Motamedi FJ, Clarkson M, Sahut-Barnola I, von Gise A, et al. WT1 maintains adrenal-gonadal primordium identity and marks a population of AGP-like progenitors within the adrenal gland. *Dev Cell*. 2013;27(1):5-18.
65. Hiemer SE, Zhang L, Kartha VK, Packer TS, Almershed M, Noonan V, Kukuruzinka M, Bais MV, Monti S, Varelas X. A YAP/TAZ-Regulated Molecular Signature Is Associated with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Molecular cancer research : MCR*. 2015;13(6):957-68.
66. Cordenonsi M, Zanconato F, Azzolin L, Forcato M, Rosato A, Frasson C, Inui M, Montagner M, Parenti AR, Poletti A, Daidone MG, Dupont S, Basso G, Bicciato S, Piccolo S. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell*. 2011;147(4):759-72.
67. Thongon N, Castiglioni I, Zucal C, Latorre E, D'Agostino V, Bauer I, Pancher M, Ballestrero A, Feldmann G, Nencioni A, Provenzani A. The GSK3beta inhibitor BIS I reverts YAP-dependent EMT signature in PDAC cell lines by decreasing SMADs expression level. *Oncotarget*. 2016;7(18):26551-66.
68. Huang X, Xiang L, Li Y, Zhao Y, Zhu H, Xiao Y, Liu M, Wu X, Wang Z, Jiang P, Qing H, Zhang Q, Liu G, Zhang W, Li A, Chen Y, Liu S, Wang J. Snail/FOXK1/Cyr61 Signaling Axis Regulates the Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in Colorectal Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(2):590-603.

69. Haque I, Mehta S, Majumder M, Dhar K, De A, McGregor D, Van Veldhuizen PJ, Banerjee SK, Banerjee S. Cyr61/CCN1 signaling is critical for epithelial-mesenchymal transition and stemness and promotes pancreatic carcinogenesis. *Mol Cancer*. 2011;10:8.
70. Borkham-Kamphorst E, Schaffrath C, Van de Leur E, Haas U, Tihaa L, Meurer SK, Nevzorova YA, Liedtke C, Weiskirchen R. The anti-fibrotic effects of CCN1/CYR61 in primary portal myofibroblasts are mediated through induction of reactive oxygen species resulting in cellular senescence, apoptosis and attenuated TGF-beta signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(5):902-14.
71. Kim KH, Chen CC, Monzon RI, Lau LF. Matricellular protein CCN1 promotes regression of liver fibrosis through induction of cellular senescence in hepatic myofibroblasts. *Mol Cell Biol*. 2013;33(10):2078-90.
72. Meyer K, Hodwin B, Ramanujam D, Engelhardt S, Sarikas A. Essential Role for Premature Senescence of Myofibroblasts in Myocardial Fibrosis. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(17):2018-28.
73. Lipson KE, Wong C, Teng Y, Spong S. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(Suppl 1):S24.
74. Sakai N, Nakamura M, Lipson KE, Miyake T, Kamikawa Y, Sagara A, Shinozaki Y, Kitajima S, Toyama T, Hara A, Iwata Y, Shimizu M, Furuichi K, Kaneko S, Tager AM, Wada T. Inhibition of CTGF ameliorates peritoneal fibrosis through suppression of fibroblast and myofibroblast accumulation and angiogenesis. *Sci Rep*. 2017;7(1):5392.
75. Garrett Q, Khaw PT, Blalock TD, Schultz GS, Grotendorst GR, Daniels JT. Involvement of CTGF in TGF-beta1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(4):1109-16.
76. Grotendorst GR, Rahmanie H, Duncan MR. Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J*. 2004;18(3):469-79.
77. Grannas K, Arngarden L, Lonn P, Mazurkiewicz M, Blokzijl A, Zieba A, Söderberg O. Crosstalk between Hippo and TGFbeta: Subcellular Localization of YAP/TAZ/Smad Complexes. *J Mol Biol*. 2015;427(21):3407-15.
78. Szeto SG, Narimatsu M, Lu M, He X, Sidiqi AM, Tolosa MF, Chan L, De Freitas K, Bialik JF, Majumder S, Boo S, Hinz B, Dan Q, Advani A, John R, Wrana JL, Kapus A, Yuen DA. YAP/TAZ Are Mechanoregulators of TGF-beta-Smad Signaling and Renal Fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(10):3117-28.
79. Attisano L, Wrana JL. Signal integration in TGF-beta, WNT, and Hippo pathways. *F1000Prime Rep*. 2013;5:17.
80. Varelas X, Miller BW, Sopko R, Song S, Gregorieff A, Fellouse FA, Sakuma R, Pawson T, Hunziker W, McNeill H, Wrana JL, Attisano L. The Hippo pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Dev Cell*. 2010;18(4):579-91.
81. Azzolin L, Panciera T, Soligo S, Enzo E, Bicciato S, Dupont S, Bresolin S, Frasson C, Basso G, Guzzardo V, Fassina A, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ incorporation in the beta-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell*. 2014;158(1):157-70.
82. Liu Y, Liu H, Meyer C, Li J, Nadalin S, Konigsrainer A, Weng H, Dooley S, ten Dijke P. Transforming growth factor-beta (TGF-beta)-mediated connective tissue growth factor (CTGF) expression in hepatic stellate cells requires Stat3 signaling activation. *J Biol Chem*. 2013;288(42):30708-19.
83. Parada C, Li J, Iwata J, Suzuki A, Chai Y. CTGF mediates Smad-dependent transforming growth factor beta signaling to regulate mesenchymal cell proliferation during palate development. *Mol Cell Biol*. 2013;33(17):3482-93.
84. Hiyama A, Morita K, Sakai D, Watanabe M. CCN family member 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) is regulated by Wnt-beta-catenin signaling in nucleus pulposus cells. *Arthritis Res Ther*. 2018;20(1):217.

85. Jiang L, Yamashita Y, Chew SH, Akatsuka S, Ukai S, Wang S, Nagai H, Okazaki Y, Takahashi T, Toyokuni S. Connective tissue growth factor and beta-catenin constitute an autocrine loop for activation in rat sarcomatoid mesothelioma. *J Pathol.* 2014;233(4):402-14.
86. Piersma B, Bank RA, Boersema M. Signaling in Fibrosis: TGF-beta, WNT, and YAP/TAZ Converge. *Front Med.* 2015;2:59.
87. Britschgi A, Duss S, Kim S, Couto JP, Brinkhaus H, Koren S, De Silva D, Mertz KD, Kaup D, Varga Z, Voshol H, Vissieres A, Leroy C, Roloff T, Stadler MB, Scheel CH, Miraglia LJ, Orth AP, Bonamy GM, Reddy VA, Bentires-Alj M. The Hippo kinases LATS1 and 2 control human breast cell fate via crosstalk with ERalpha. *Nature* 2017; 541:541-545
88. Torigata K, Daisuke O, Mukai S, Hatanaka A, Ohka F, Motooka D, Nakamura S, Ohkawa Y, Yabuta N, Kondo Y, Nojima H. LATS2 Positively Regulates Polycomb Repressive Complex 2. *PLoS One* 2016; 11:e0158562
89. Bland ML, Fowkes RC, Ingraham HA. Differential requirement for steroidogenic factor-1 gene dosage in adrenal development versus endocrine function. *Molecular endocrinology.* 2004;18(4):941-52.
90. Gut P, Huber K, Lohr J, Bruhl B, Oberle S, Treier M, Ernsberger U, Kalchheim C, Unsicker K. Lack of an adrenal cortex in Sf1 mutant mice is compatible with the generation and differentiation of chromaffin cells. *Development.* 2005;132(20):4611-9.
91. Huang CC, Liu C, Yao HH. Investigating the role of adrenal cortex in organization and differentiation of the adrenal medulla in mice. *Molecular and cellular endocrinology.* 2012;361(1-2):165-71.
92. King P, Paul A, Laufer E. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:21185-21190
93. Pihlajoki M, Gretzinger E, Cochran R, Kyronlahti A, Schrade A, Hiller T, et al. Conditional mutagenesis of Gata6 in SF1-positive cells causes gonadal-like differentiation in the adrenal cortex of mice. *Endocrinology.* 2013;154(5):1754-67.
94. Lee FY, Faivre EJ, Suzawa M, Lontok E, Ebert D, Cai F, et al. Eliminating SF-1 (NR5A1) sumoylation in vivo results in ectopic hedgehog signaling and disruption of endocrine development. *Dev Cell.* 2011;21(2):315-27.
95. Huber K. The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives. *Dev Biol.* 2006;298(2):335-43.
96. Parlato R, Otto C, Tuckermann J, Stotz S, Kaden S, Grone HJ, Unsicker K, Schütz G. Conditional inactivation of glucocorticoid receptor gene in dopamine-beta-hydroxylase cells impairs chromaffin cell survival. *Endocrinology.* 2009;150(4):1775-81.

3.9 Figures

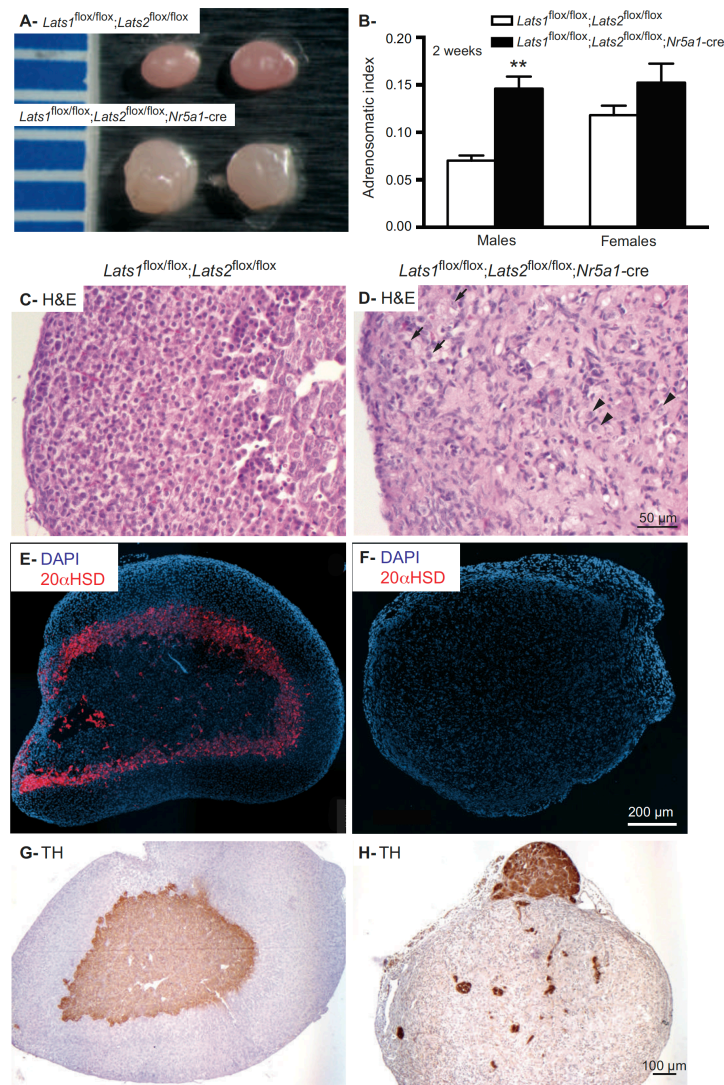


Figure 1. Adrenal glands of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice are larger than controls and are histomorphologically abnormal. **A)** Photographs of adrenal gland from 12 dpp *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox}* (control) and *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* males. Ruler graduations are in millimeters. **B)** Adrenosomatic index (adrenal gland weight/corporal weight) comparing male *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox}* (n = 12) to *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* (n = 8) and female *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox}* (n = 10) to *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* (n = 8) mice. Data are expressed as means (columns) ± SEM (error bars). Asterisks = significantly different from control (** P < 0.01). **C, D)** Photomicrographs comparing the adrenal glands of 12 dpp male (C) *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox}* and (D) *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice. **E, F)** Immunofluorescence analysis of 20αHSD expression in adrenal glands from 12 dpp female (E) *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox}* and (F) *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice. **G, H)** Immunohistochemical analysis of TH expression in adrenal glands from 12 dpp male (G) *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox}* and (H) *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice. H & E = Hematoxylin and eosin stain, TH = tyrosine hydroxylase, Arrow = cells with lipid droplets in their cytoplasm. Arrowhead = cells with a large nucleus and eosinophilic cytoplasm. Scale bar in D is valid for C, scale bar in F is valid for E and scale bar in G is valid for H.

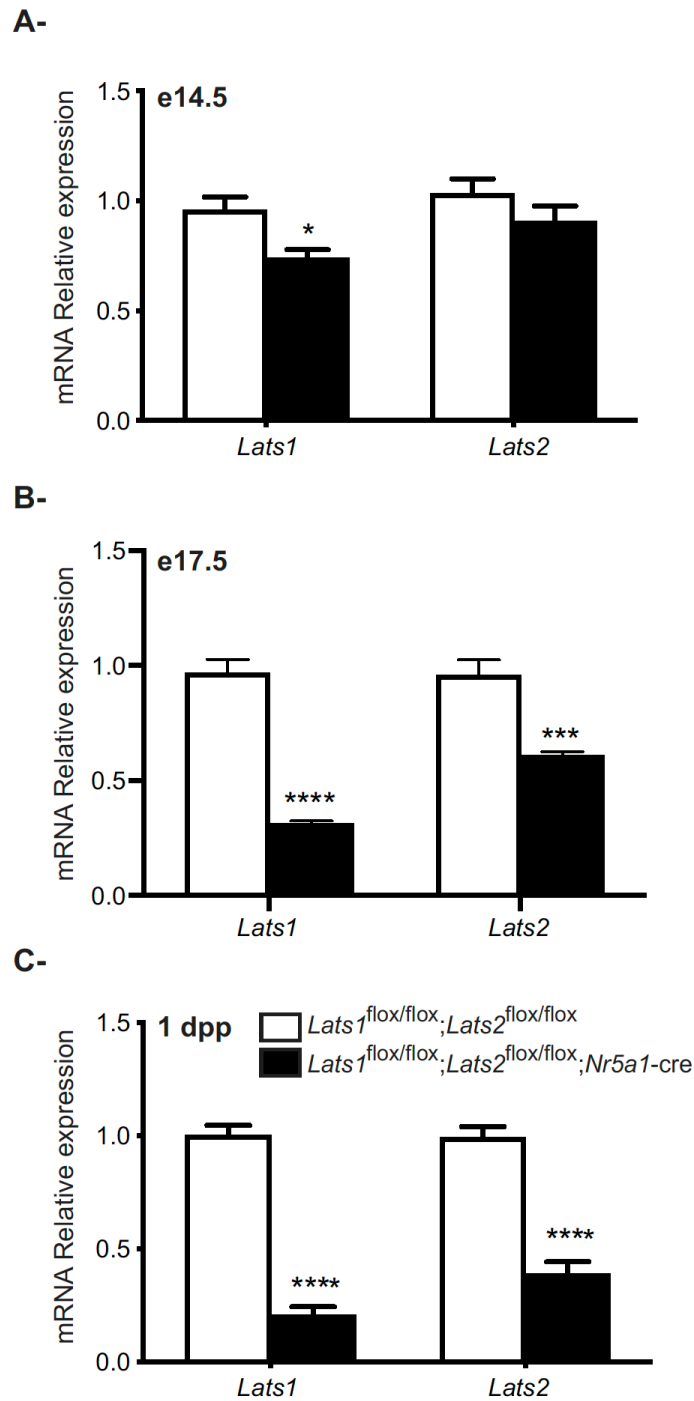


Figure 2. Efficiency of *Lats1* and *Lats2* knockdown in *Lats1*^{flx/flx};*Lats2*^{flx/flx};*Nr5a1-cre* mice. **A-C)** RT-qPCR analysis of *Lats1* and *Lats2* mRNA levels in the adrenal glands of (A) e14.5, (B) e17.5 and (C) 1 dpp male mice of the indicated genotypes (n = 6 animals/genotype). All data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as means (columns) ± SEM (error bars). Asterisks = significantly different from control (* P < 0.05; *** P < 0.001; **** P < 0.0001).

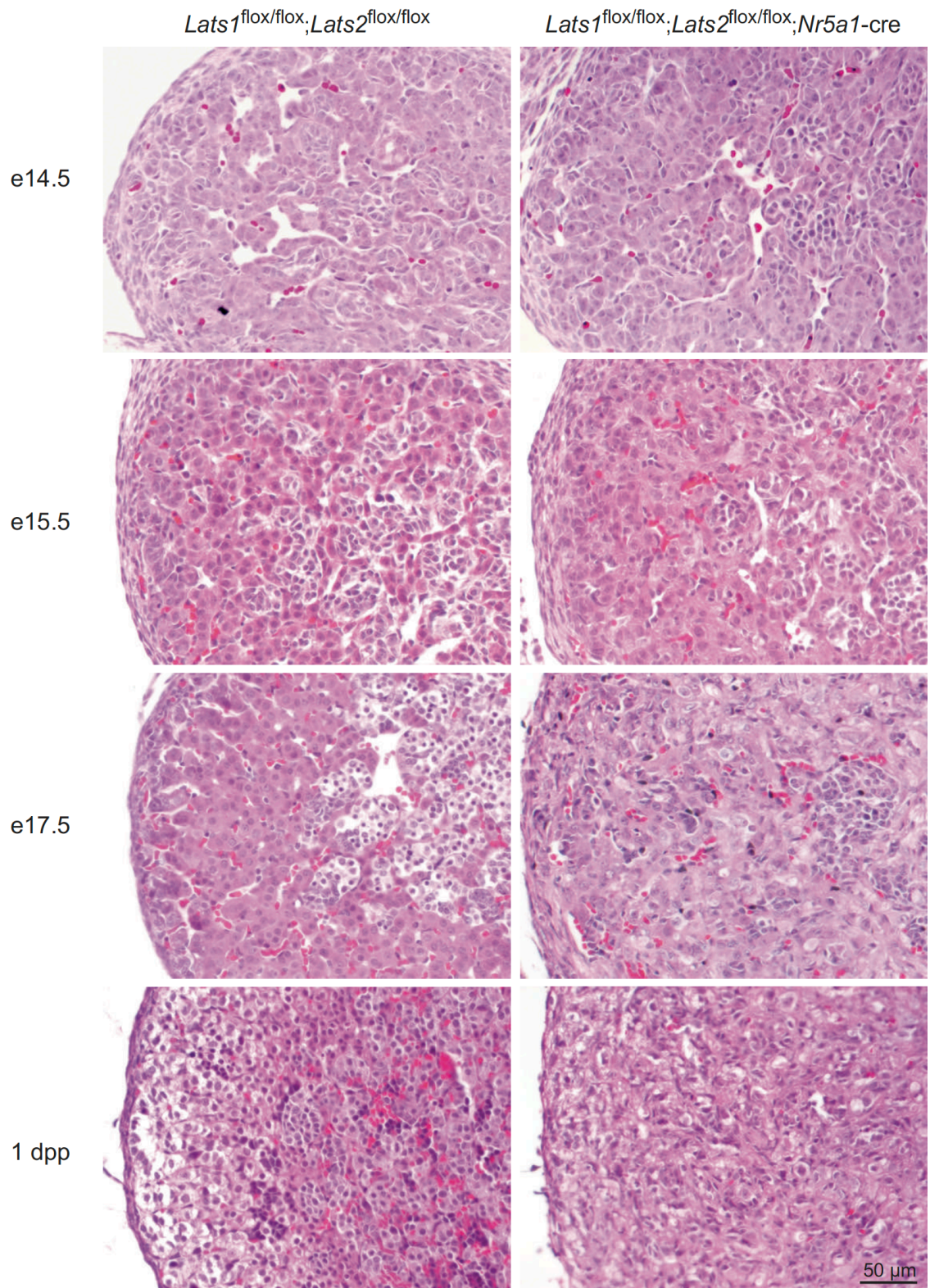


Figure 3. Progressive appearance of spindle-shaped cells in the adrenal cortex of *Lats1*^{flox/flox};*Lats2*^{flox/flox};*Nr5a1*-cre mice. Photomicrographs comparing male adrenal gland histology of *Lats1*^{flox/flox};*Lats2*^{flox/flox};*Nr5a1*-cre with that of *Lats1*^{flox/flox};*Lats2*^{flox/flox} controls at the indicated ages. Scale bar (lower right) is valid for all images. Hematoxylin and eosin stain.

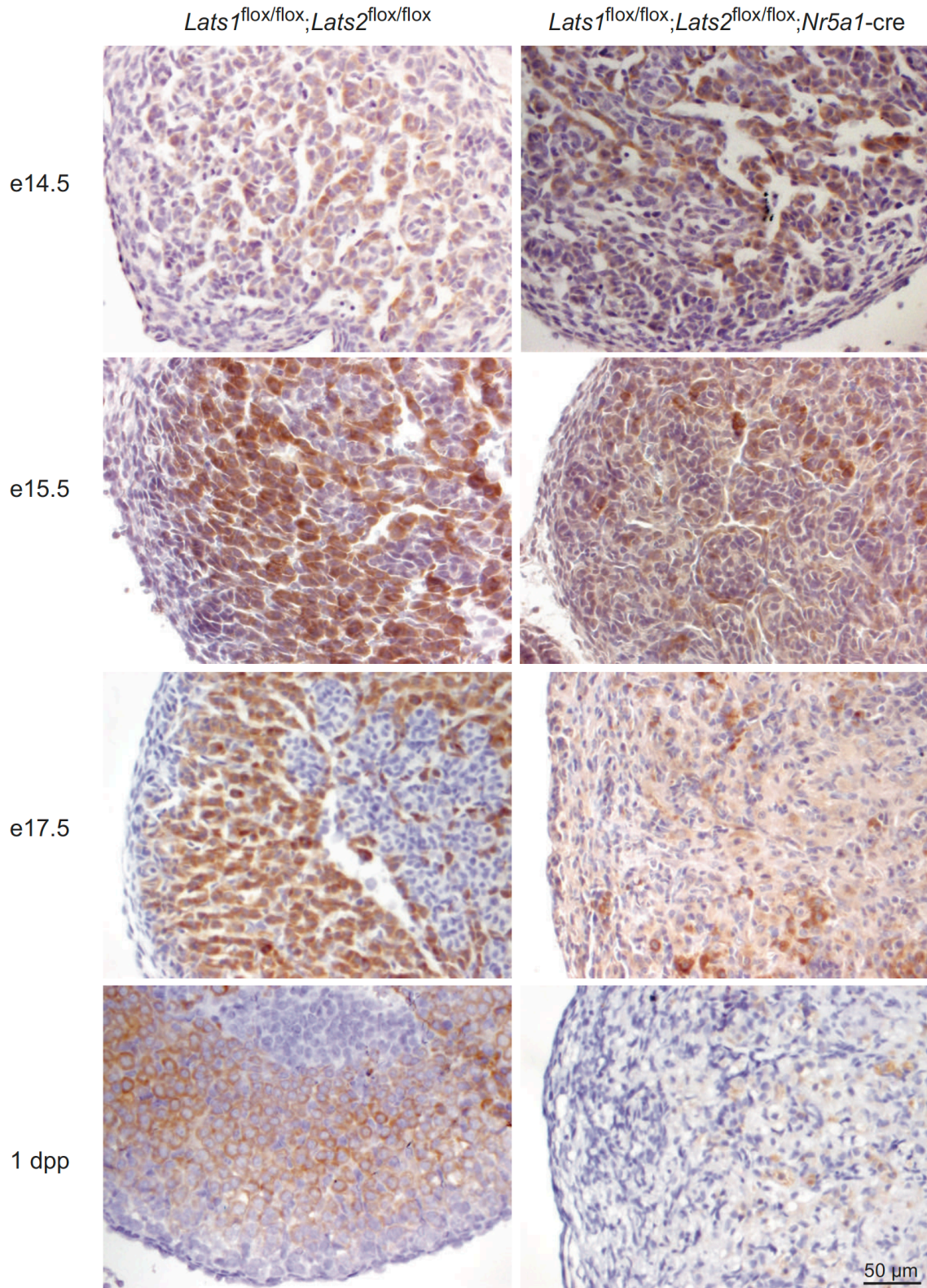


Figure 4. Reduction of CYP11B1 expression in the adrenal cortex of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice during development. Immunohistochemical analysis of CYP11B1 expression in adrenal glands from e14.5, e15.5, e17.5 and 1 dpp male mice of the indicated genotypes. Scale bar (lower right) is valid for all images.

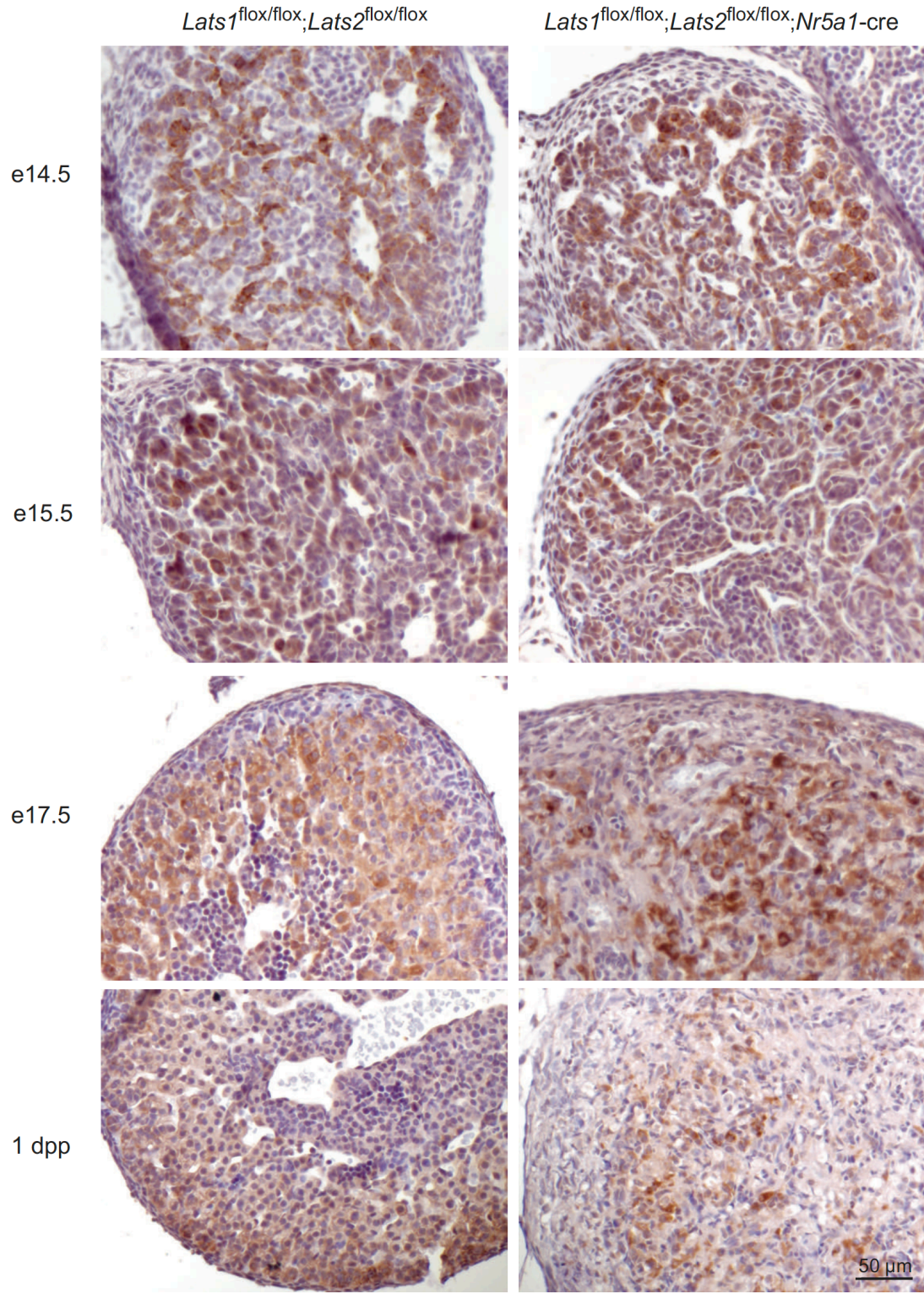


Figure 5. Progressive reduction of STAR expression in the adrenal cortex of *Lats1*^{flox/flox};*Lats2*^{flox/flox};*Nr5a1*-cre mice during development. Immunohistochemical analysis of STAR expression in adrenal glands from e14.5, e15.5, e17.5 and 1 dpp male mice of the indicated genotypes. Scale bar (lower right) is valid for all images.

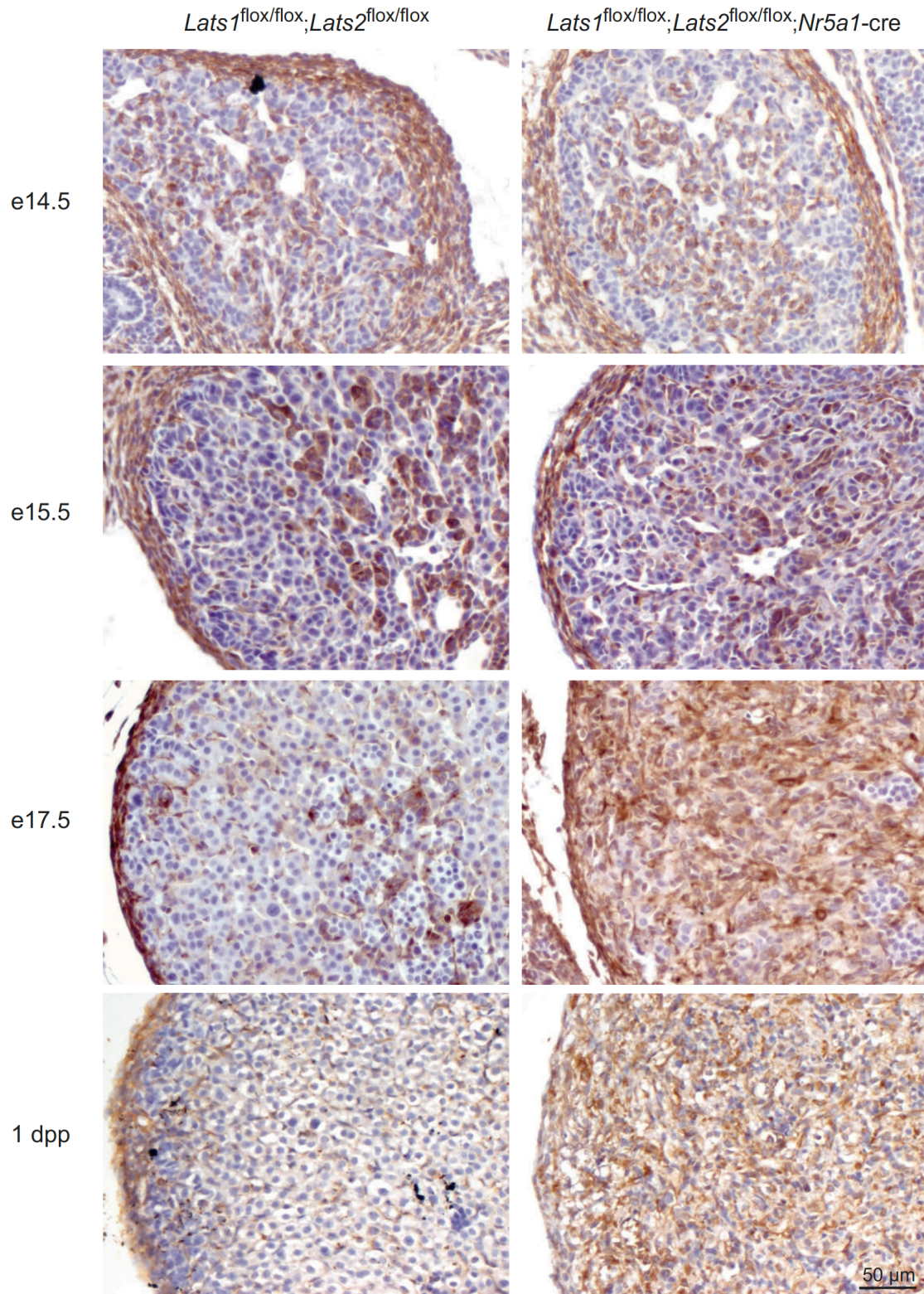


Figure 6. Progressive increase of vimentin expression in the adrenal cortex of *Lats1*^{flox/flox};*Lats2*^{flox/flox};*Nr5a1-cre* mice during development. Immunohistochemical analysis of vimentin expression in adrenal glands from e14.5, e15.5, e17.5 and 1 dpp male mice of the indicated genotypes. Scale bar (lower right) is valid for all images.

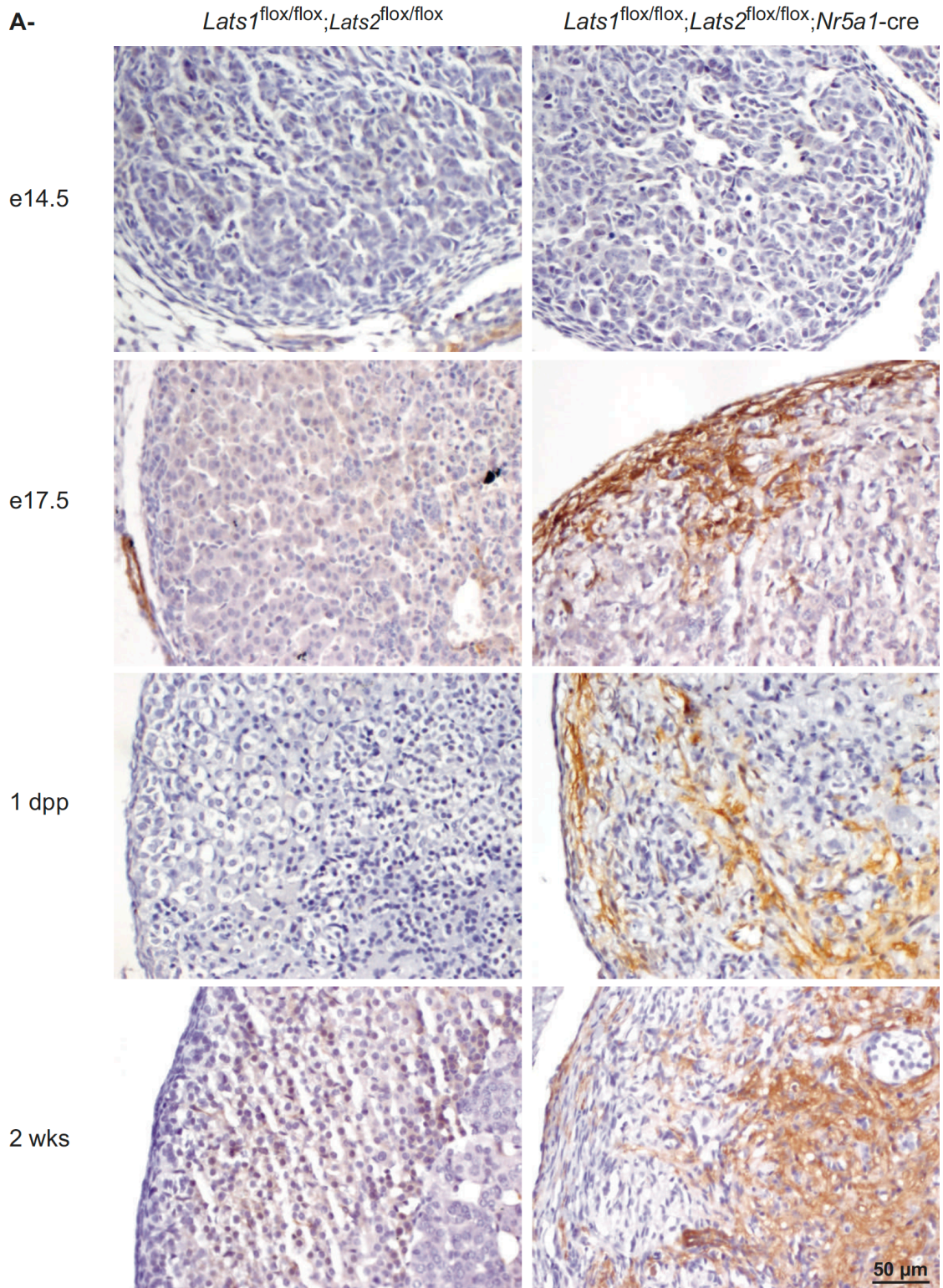


Figure 7. Progressive increase of α -SMA expression in a subpopulation of adrenocortical cells in *Lats1*^{flox/flox};*Lats2*^{flox/flox};*Nr5a1-cre* mice. Immunohistochemical analysis of α -SMA expression in adrenal glands from e14.5, e17.5, 1 dpp and 12 dpp male mice of the indicated genotypes. Scale bar (lower right) is valid for all images.

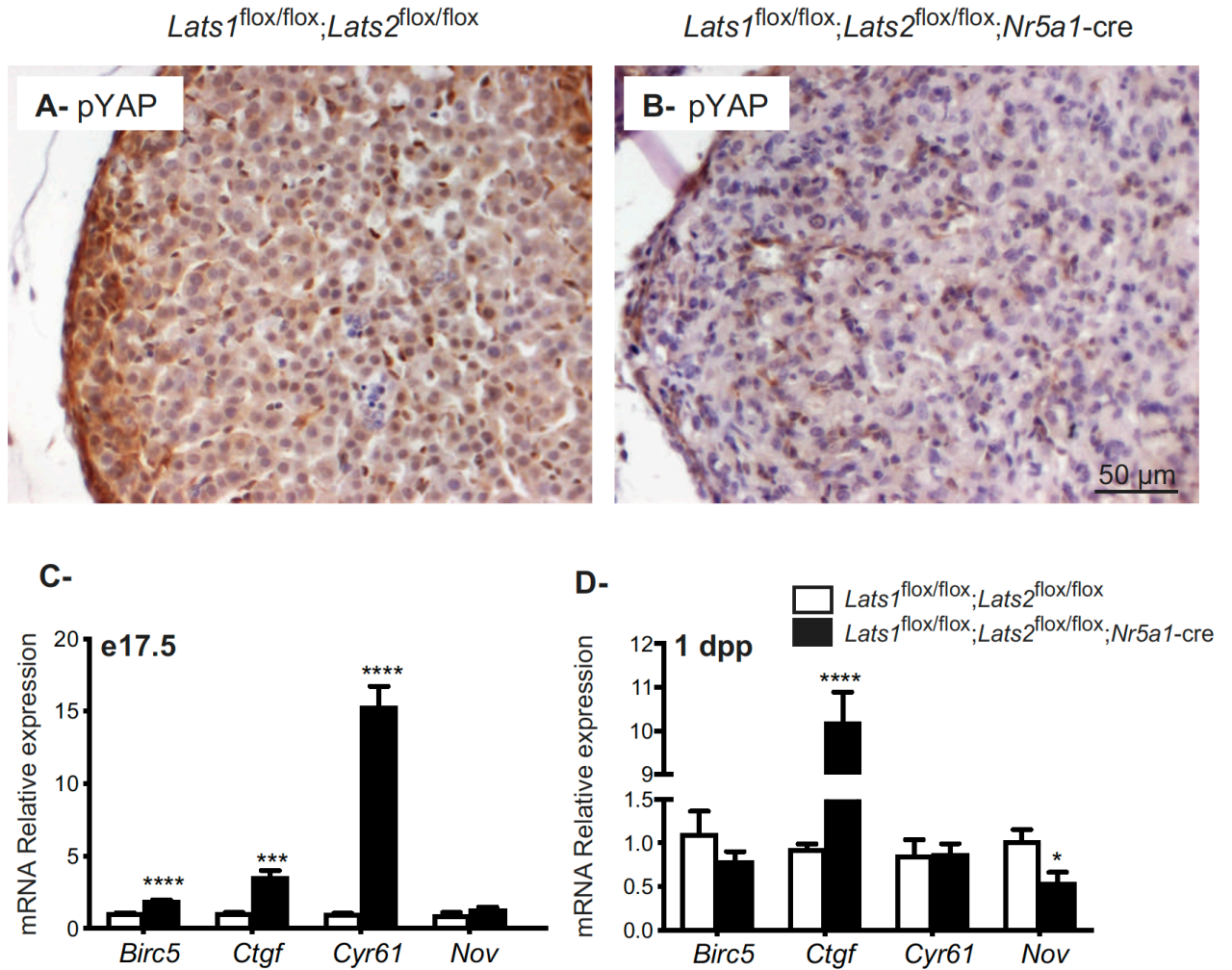


Figure 8. *Lats1* and *Lats2* deletion causes a decrease in the phosphorylation of YAP and an increase in the expression of YAP and TAZ downstream target genes in *Lats1*^{flox/flox};*Lats2*^{flox/flox};*Nr5a1-cre* mice. **A, B**) Immunohistochemical analysis of phospho-YAP expression in adrenal glands from e17.5 dpp male mice of the indicated genotypes. Scale bar in B is valid for all images. **C, D**) RT-qPCR analysis of Hippo target genes mRNA levels in the adrenal glands of (C) e17.5 and (D) 1 dpp male mice of the indicated genotypes (n = 6 animals/genotype). All data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as means (columns) ± SEM (error bars). Asterisks = significantly different from control (* P < 0.05; *** P < 0.001; **** P < 0.0001).

3.10 Supplementary Table

Table S1. Quantitative RT-qPCR primer sequences

Gene	Forward	Reverse
<i>Acta2</i>	AGCCATCTTTCATTGGGATGG	CCCCTGACAGGACCTTGTTA
<i>Birc5</i>	TCATCCACTGCCCTACCGAG	CAGGGGAGTGCTTTCTATGCT
<i>Cald1</i>	GTTGCTGCCCTAGAGATAGTCA	AACCTTTGACTGTCCACCCC
<i>Cnn1</i>	TGTTGCGCTTGCTGTGTCA	CTGGGCCAGCTTGTTCTTTAC
<i>Ctgf</i>	GAGGAAAACATTAAGAAGGGCAAAA	CCGCAGAACTTAGCCCTGTA
<i>Cyp11b1</i>	GCTTCACCATGTGCTGAAATCC	AGAAGAGAGGGCAATGTGTCA
<i>Cyp11b2</i>	GCACCAGGTGGAGAGTATGC	CCATTCTGGCCCATTTAGC
<i>Cyr61</i>	TTGACCAGACTGGCGCTCT	AGTTTTGCTGCAGTCCTCGT
<i>Hsd3b</i>	AGCTGCAGACAAAGACCAAGGTGA	GAACACAGGCCTCCAATAGGTTCT
<i>Lats2</i>	TGCACTGGATTCAAGGTGGACTCA	GAGAATGTGCCAGGCACCTCT
<i>Mc2r</i>	TGGAAAAGTTCTCAGACCAC	TCTTTGTGTGGAAGGATCTGG
<i>Nov</i>	AGAGTTGTTCTGAGATGAGACCC	CCCTCTGGAACCATGCAAATG
<i>Nr5a1</i>	TCTCTAACCGCACCATCA	TCGACAATGGAGATAAAAGGT
<i>Rpl19</i>	CTGAAGGTCAAAGGGAATGTG	GGACAGAGTCTTGATGATCTC
<i>Snai1</i>	CCCACTGGTGAGAAGCCATTC	GACATGCGGGAGAAGGTTCCG
<i>Spp1</i>	CCTTGCTTGGGTTTGCAGTC	TGGTCGTAGTTAGTCCCTCAGA
<i>Star</i>	GATTAAGGCACCAAGCTGTGCTG	CTGCTGGCTTTCCTTCTCCAGC
<i>Th</i>	GAAAAACTCTCCACGGTGACTG	GAGTGCAGGAGCTCTCCAAG

3.11 Supplementary Figures

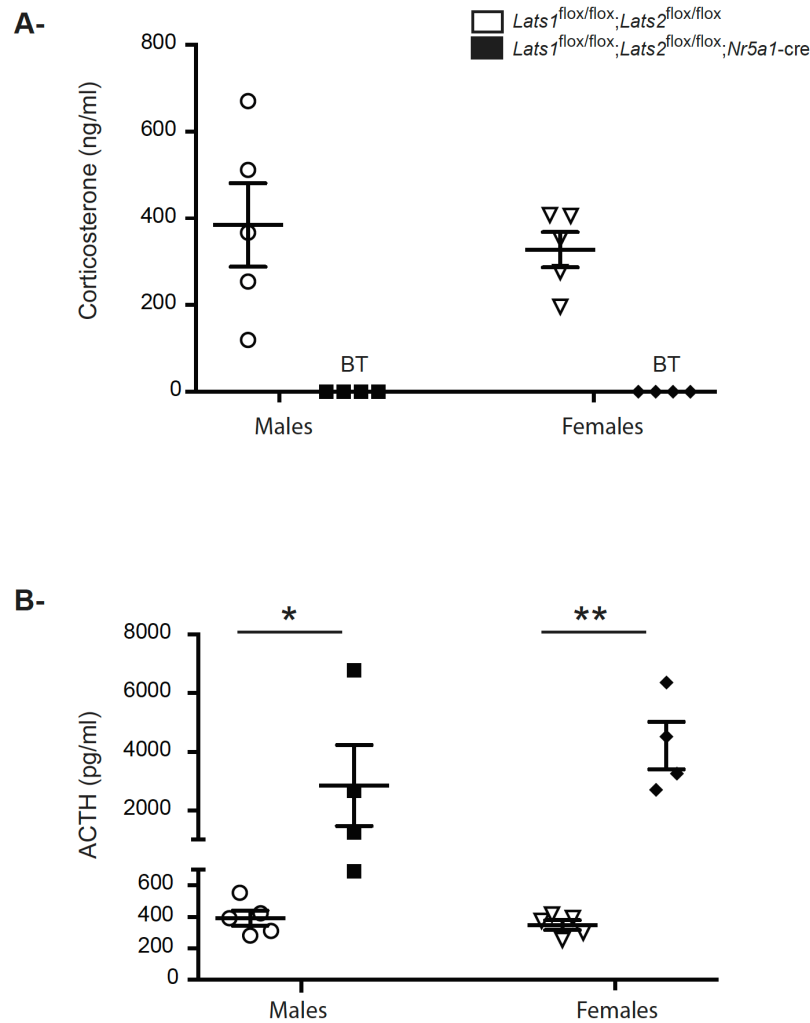


Figure S1. Adrenal gland failure is responsible for the death of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice. **A)** Plasma corticosterone levels in 10-12 dpp male and female *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice. **B)** Plasma ACTH levels in 10-12 dpp male and female *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice. Data are expressed as scattered plot (*Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox}* male and female, n = 5; *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* males and females, n = 4), bars integrated to the plot represent the means \pm SEM. BT = below threshold (< 14.9 ng/ml). Asterisks = significantly different from control (* P < 0.05; ** P < 0.01).

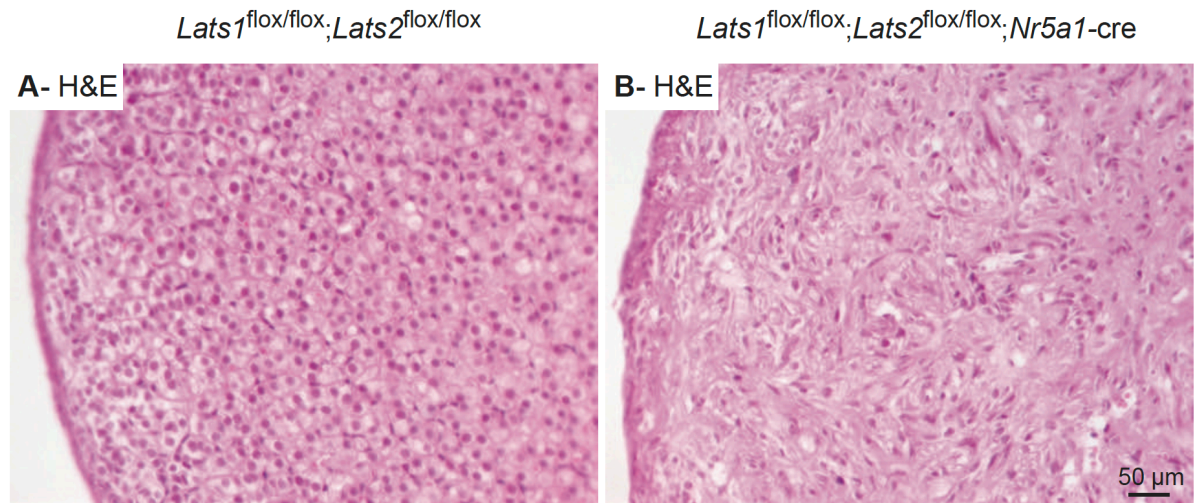


Figure S2. Adrenal glands of female *Lats1*^{flox/flox};*Lats2*^{flox/flox};*Nr5a1-cre* mice have a phenotype similar to the one observed in male. **A, B**) Photomicrographs comparing the adrenal glands of 12 dpp female (C) *Lats1*^{flox/flox};*Lats2*^{flox/flox} and (D) *Lats1*^{flox/flox};*Lats2*^{flox/flox};*Nr5a1-cre* mice. Scale bar in B is valid for A.

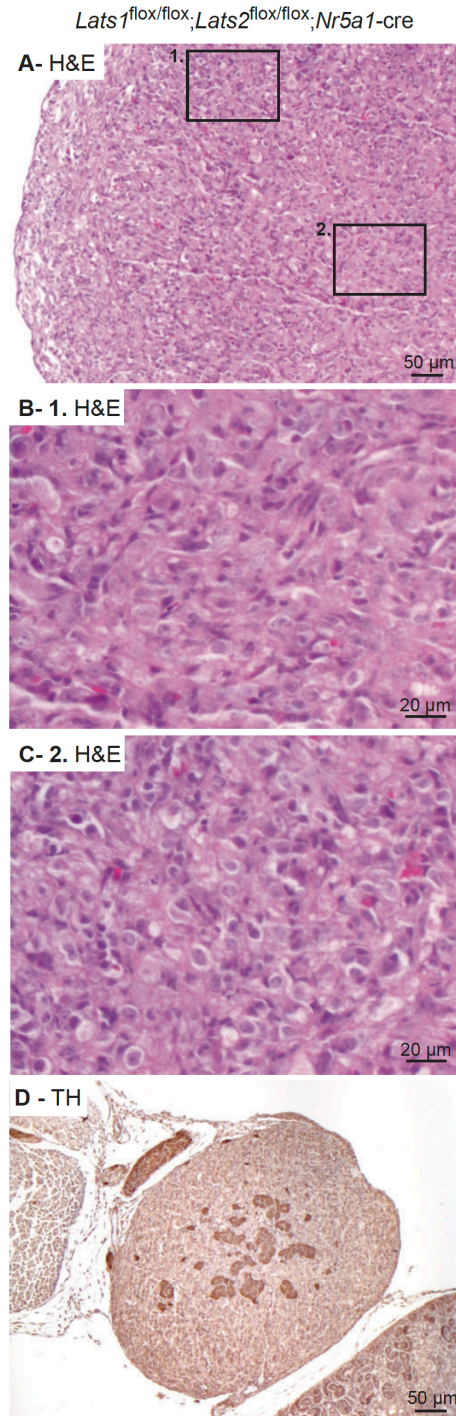


Figure S3. Adrenal glands of *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice at late stages of development. **A)** Photomicrograph of the adrenal gland of a 1 dpp male *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mouse. **B)** Higher magnification of the boxed area 1 in photomicrograph (A) to illustrate a region with spindle-shaped cells. **C)** Higher magnification of the boxed area 2 in photomicrograph (A) to illustrate a population of larger and rounder cells. **D)** Immunohistochemical analysis of TH expression in the adrenal gland from a male e17.5 *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}* mouse.

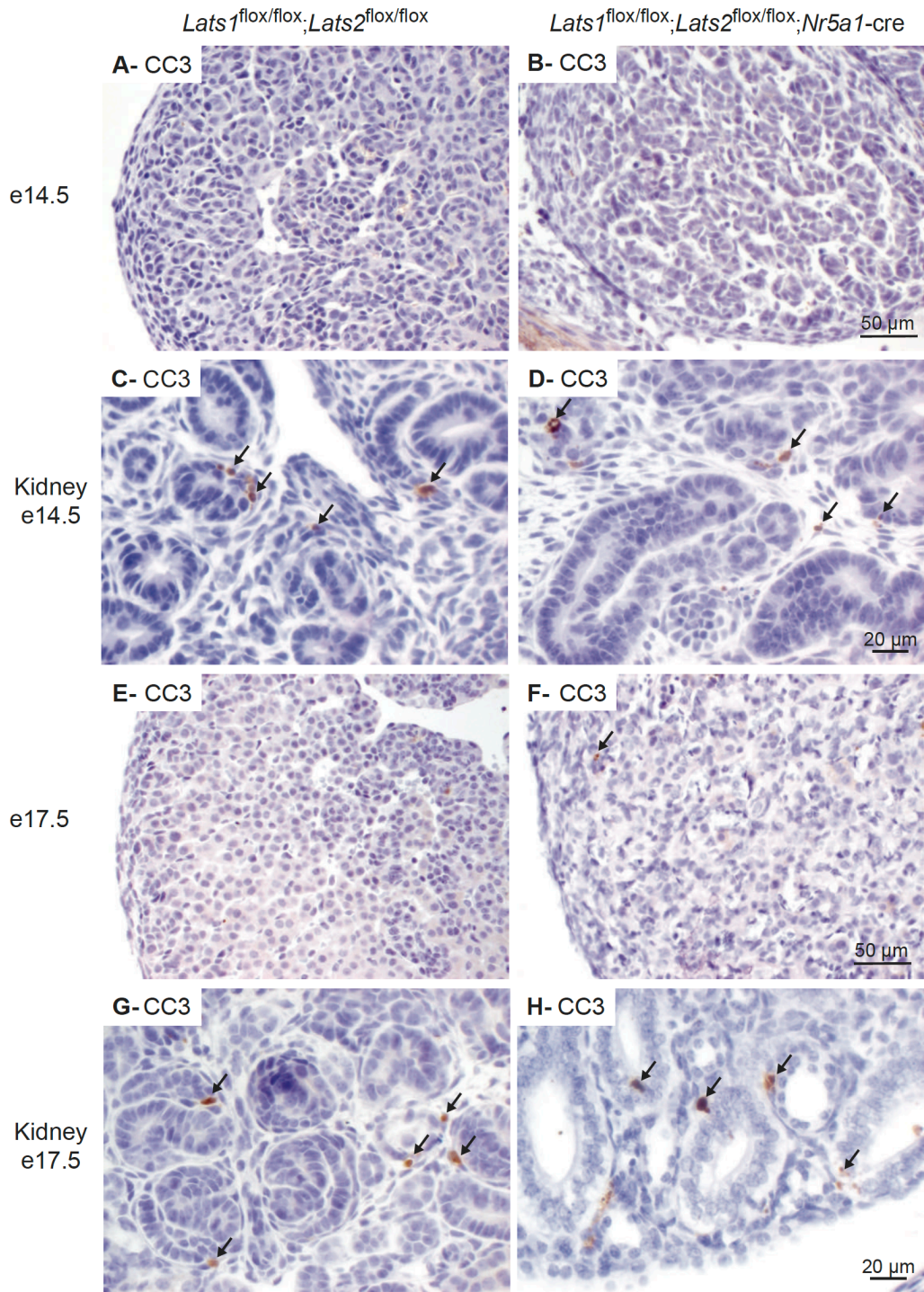


Figure S4. Apoptosis is not increased in *Lats1*^{flox/flox}; *Lats2*^{flox/flox}; *Nr5a1-cre* mice. **A-D)** Immunohistochemical analysis of cleaved-caspase 3 expression in adrenal glands from (A, B) e14.5 and (C, D) e17.5 male mice of the indicated genotypes. **E, F)** Immunohistochemical analysis of cleaved-caspase 3 expression in the adjacent kidneys from e17.5 mice of the indicated genotypes (positive controls). Arrows = Cleaved-caspase 3-positive cells.

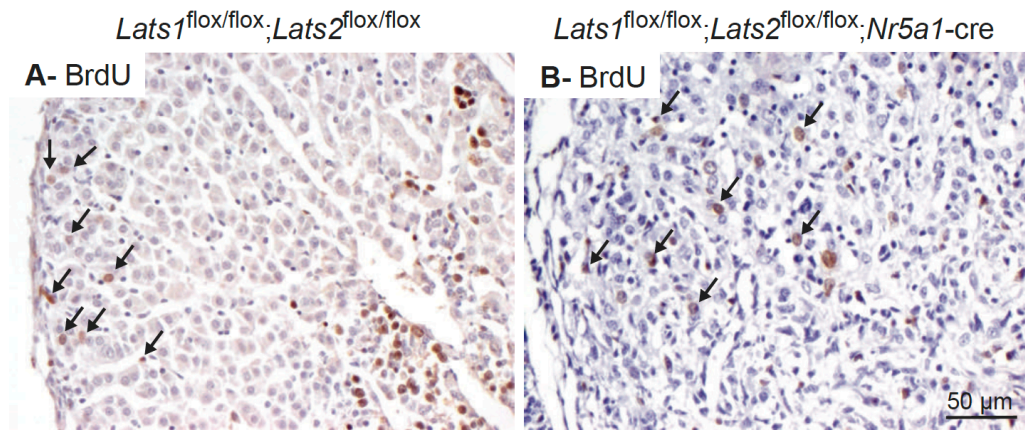


Figure S5. Adrenal cell proliferation in *Lats1^{flox/flox};**Lats2^{flox/flox};**Nr5a1-cre* mice. Immunohistochemical analysis of BrdU incorporation in adrenal glands from e17.5 male mice of the indicated genotypes. Arrows = BrdU-positive cells. Scale bar (right panel) is valid for both images.

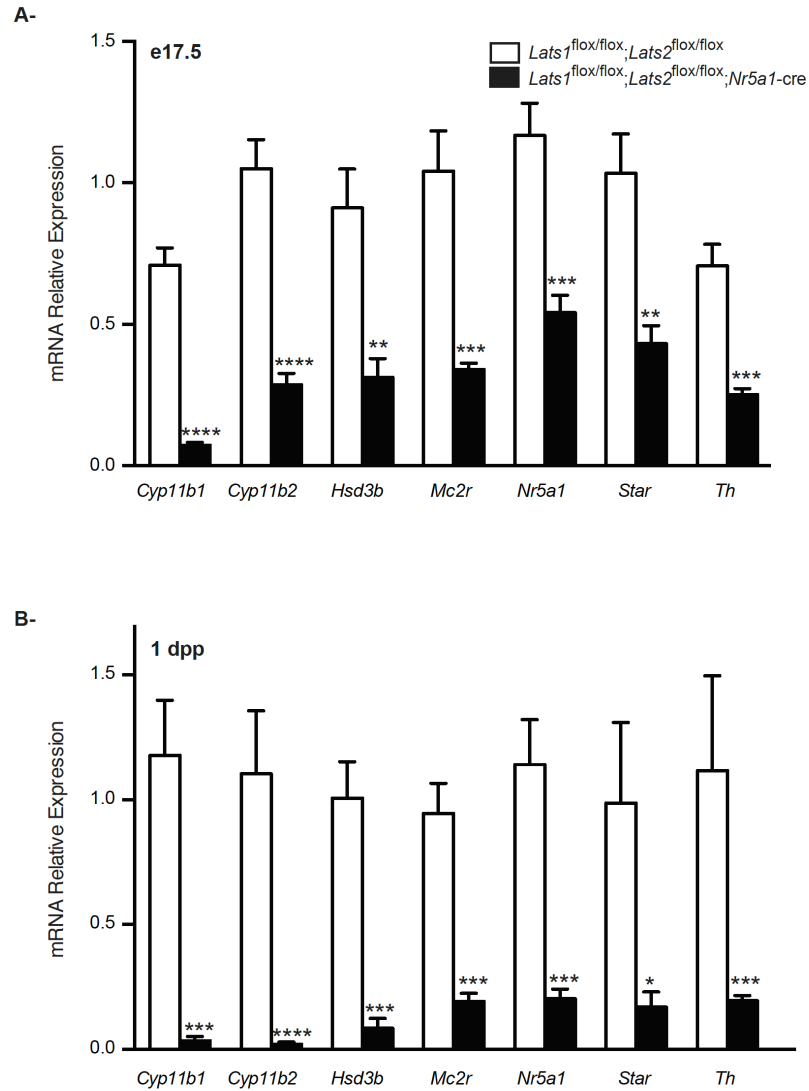


Figure S6. Expression of steroidogenic markers is altered in the adrenal glands of *Lats1*^{flox/flox};*Lats2*^{flox/flox};*Nr5a1-cre* mice. **A, B** RT-qPCR analysis of tyrosine hydroxylase and genes involved in steroidogenesis in adrenal glands from (A) e17.5 and (B) 1 dpp male mice of the indicated genotypes (n = 6 animals/genotype). All data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as means (columns) ± SEM (error bars). Asterisks = significantly different from control (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001).

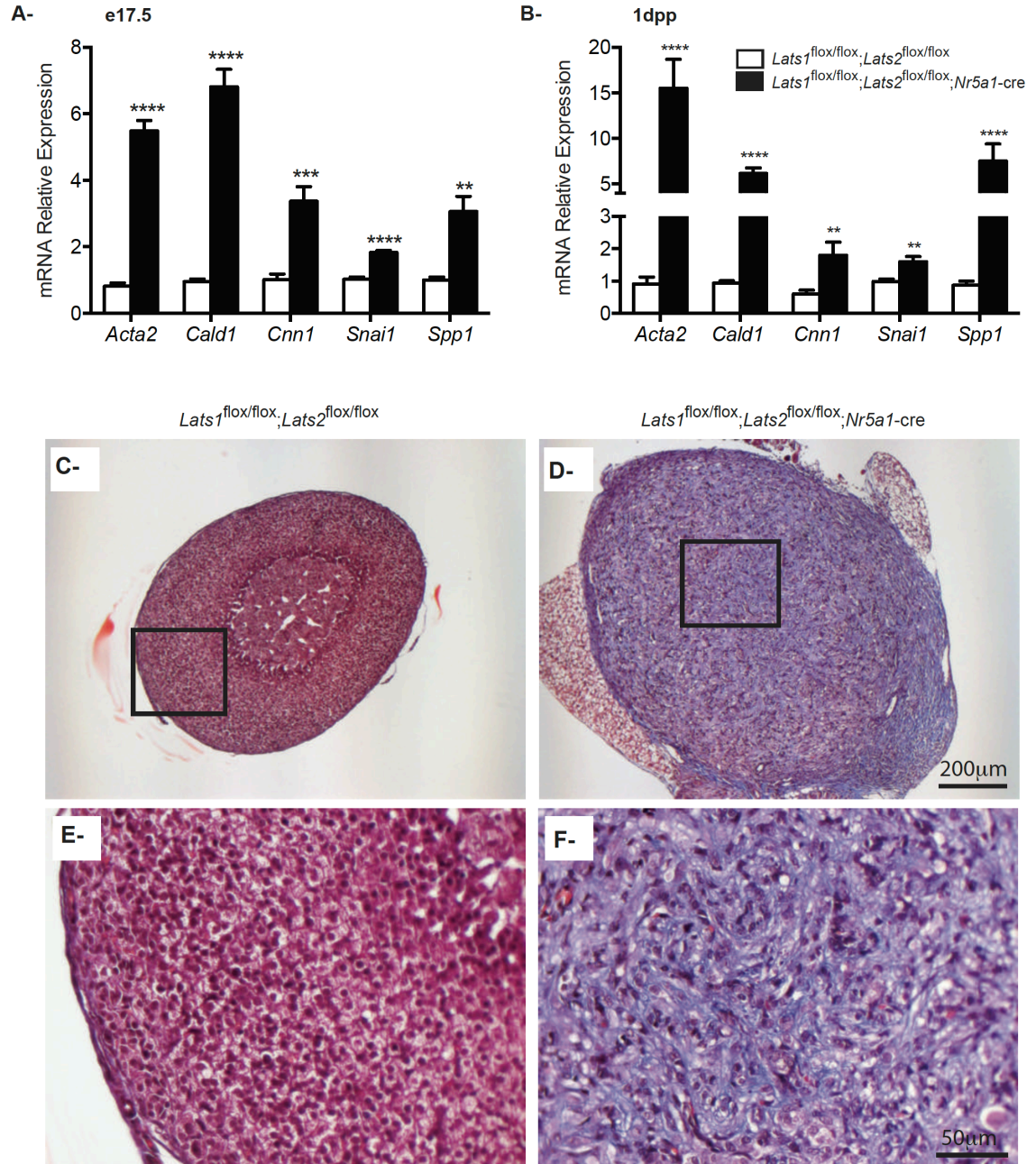


Figure S7. Expression of fibrosis and myofibroblast-specific genes is increased in *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* mice. **A, B** RT-qPCR analysis of myofibroblast markers in adrenal glands from (A) e17.5 and (B) 1 dpp male mice of the indicated genotypes (n = 6 animals/genotype). All data were normalized to the housekeeping gene *Rpl19* and are expressed as means (columns) ± SEM (error bars). Asterisks = significantly different from control (** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001). **C- F** Masson's trichrome staining performed on 12 dpp male mice of the indicated genotypes. **E, F** Higher magnification of the boxed area in C and D. Scale bar in D is valid for C. Scale bar in F is valid for E.

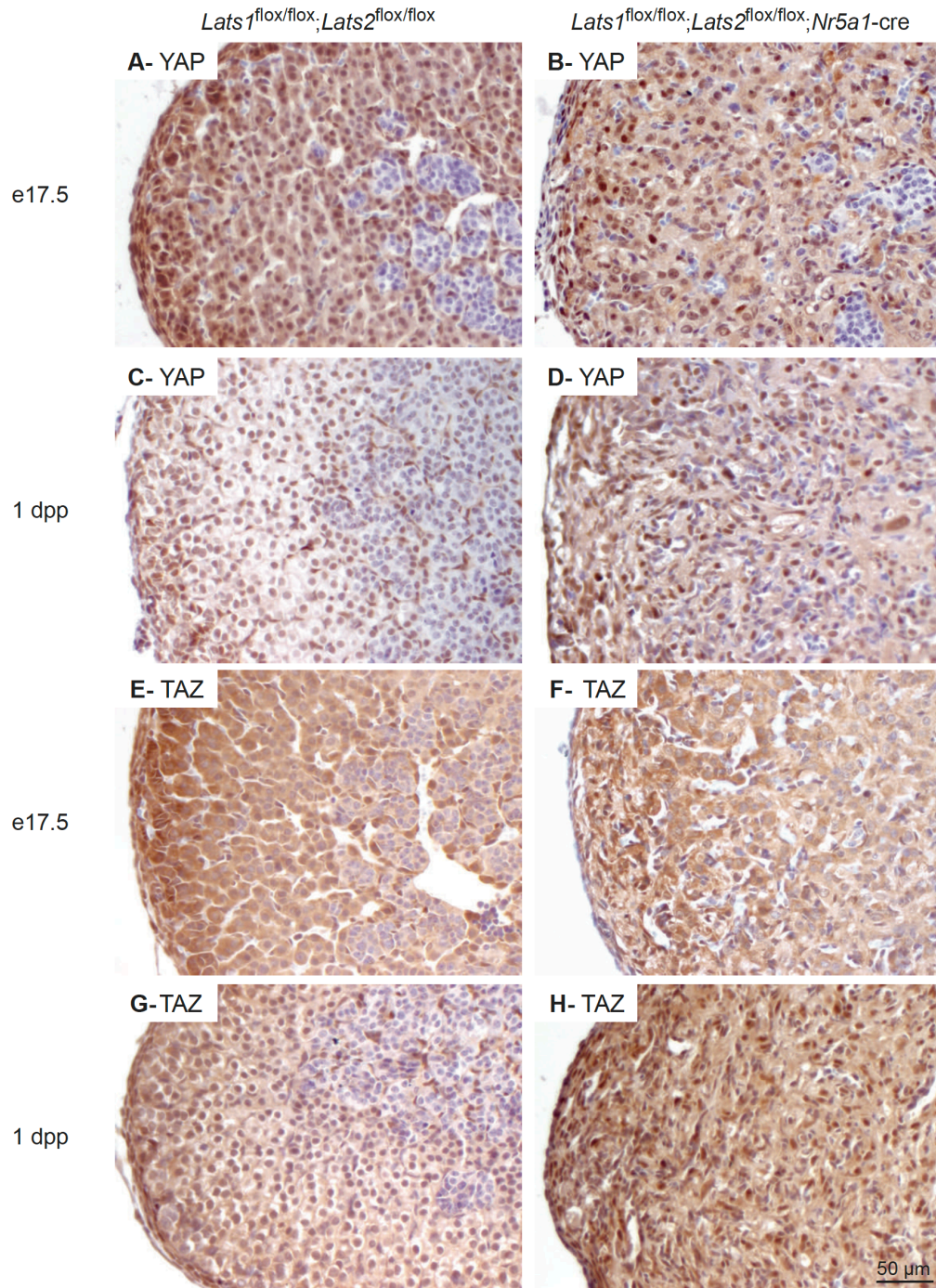


Figure S8. *Lats1* and *Lats2* deletion causes an increase in the nuclear expression of YAP and TAZ and their downstream target genes in *Lats1^{flox/flox};**Lats2^{flox/flox};**Nr5a1-cre* mice. **A-D)** Immunohistochemical analysis of YAP expression in adrenal glands from (A, B) e17.5 and (C, D) 1 dpp male mice of the indicated genotypes. **E-H)** Immunohistochemical analysis of TAZ expression in male adrenal glands from (E, F) e17.5 and (G, H) 1 dpp male mice of the indicated genotypes. Scale bar (lower right) is valid for all images.

Chapitre 4 – Discussion

4.1 Pourquoi étudier le développement de la glande surrénale?

La formation des organes repose sur un équilibre coordonné entre la différenciation des cellules, leur prolifération et leur mort programmée afin de générer des tissus ayant une taille, une forme et une fonction précises. La voie Hippo s'est avérée jouer un rôle primordial dans la régulation de cet équilibre par l'intermédiaire de ses composantes, dont LATS1, LATS2, YAP et TAZ, en intégrant des signaux diversifiés dans plusieurs organes en développement (222). Bien qu'il ait été démontré que YAP et TAZ participaient à l'homéostasie du cortex surrénalien durant la vie adulte (370), la contribution de la voie Hippo dans son développement n'a jamais été étudiée. Puisque la voie Hippo est nécessaire au développement normal de très nombreux organes, nous avons émis l'hypothèse qu'elle le serait également pour la glande surrénale, ce qui a mené à l'élaboration de ce projet.

En plus d'élargir nos connaissances en lien avec la voie Hippo, démystifier les mécanismes moléculaires qui gouvernent la formation des glandes surrénales pourrait avoir des répercussions cliniques importantes. Quoique relativement rares, les défauts dans le développement des glandes surrénales sont des conditions médicales graves qui entraînent une insuffisance surrénalienne fatale sans traitement (372). Même si le séquençage de nouvelle génération a permis d'identifier certaines mutations en cause chez des patients humains pédiatriques souffrant d'hypoplasie surrénalienne (372) (*Dax1* (373, 374), *Sf1* (375), *Sterile Alpha Motif Domain Containing 9* (*Samd9*) (376) et *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1C* (*CDKN1C*) (377, 378)), l'étiologie demeure un mystère chez certains patients. Des dérèglements de la signalisation Hippo pourraient-ils être impliqués dans le développement de ces pathologies ? De plus, il a récemment été démontré que la surexpression de YAP dans les tumeurs adrénocorticales pédiatriques humaines était associée à un moins bon pronostic, avec une plus grande incidence de métastases et de récurrence ainsi qu'une survie diminuée des patients (371), mais le mécanisme en cause n'a pas été investigué. Les études portant sur plusieurs types de tumeurs ont révélé que YAP/TAZ agissent comme oncogènes, en favorisant la prolifération, la survie cellulaire, la migration et l'invasion des tissus, tandis que LATS1/2 sont plutôt des suppresseurs tumoraux, comme leurs noms l'indiquent (209, 314, 379). Les souris *Lats1^{flox/flox}*, *Lats2^{flox/flox}*; *Nr5a1-cre* auraient potentiellement pu aider à identifier le rôle joué par la voie Hippo dans les tumeurs adrénocorticales, mais le phénotype embryonnaire s'est avéré trop sévère pour permettre le développement de tumeurs.

4.2 Retour sur les résultats

Les expériences menées dans ce projet, visant à caractériser les souris déficientes en *Lats1/2* dans les tissus stéroïdiens (modèle *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre*), ont permis de découvrir un tout nouveau rôle de la voie Hippo dans le développement de l'adrénocortex. Plus concrètement, les kinases LATS1 et LATS2 empêchent, de manière fonctionnellement redondante, la transdifférenciation des cellules adrénocorticales en cellules de type myofibroblastique qui ont perdu leur capacité de stéroïdogénèse durant le développement. Ce changement d'identité cellulaire s'apparente à une transdifférenciation et est probablement causé, du moins en partie, par une augmentation de l'activité de YAP/TAZ associée à l'inactivation de la voie Hippo. Rappelons que la différenciation est le processus où une cellule acquiert des propriétés et des fonctions particulières pour se spécialiser en un type cellulaire précis tandis que la transdifférenciation est un processus durant lequel une cellule non-souche ou une cellule déjà différenciée perd ses propriétés et ses fonctions pour en acquérir de nouvelles (changement de type cellulaire).

L'étude du modèle *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* nous a également permis de corroborer l'idée désormais bien acceptée que le cortex surrénalien est nécessaire à la croissance de la médulla. En effet, une diminution de la taille de la médulla et une localisation ectopique ont été observées dans plusieurs modèles murins transgéniques présentant des anomalies de développement du cortex (91, 115, 134, 187, 188, 380). De manière similaire, on observe un plus petit nombre de cellules chromaffines chez les souris *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* et elles sont disséminées dans la glande ou regroupées dans un amas en périphérie du cortex au lieu d'adopter une localisation centrale. Ce phénomène suggère que les cellules myofibroblastiques observées ne sécrètent probablement pas les facteurs nécessaires à la migration ou à la prolifération des cellules chromaffines, ou que l'altération de l'architecture du cortex n'offre pas un support structurel adéquat. Les cellules ont toutefois maintenu un certain niveau de différenciation, car elles expriment toujours la tyrosine hydroxylase, une enzyme impliquée dans la synthèse des catécholamines (381). Il aurait été intéressant de faire un test de réaction chromaffine, qui consiste à détecter l'épinéphrine ou la norépinéphrine par immunohistochimie, afin de déterminer si la médulla a conservé sa fonction de synthèse de catécholamines malgré les changements morphologiques qu'elle a subis.

Durant le développement et la vie post-natale, le maintien de l'homéostasie du cortex surrénalien repose sur un équilibre très fin entre la prolifération, la migration et la différenciation des cellules souches

et des cellules progénitrices sous-capsulaires en cellules adrénocorticales fonctionnelles; cet équilibre est maintenu par l'interaction entre plusieurs voies de signalisation. L'étude des souris *Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}* a récemment montré que la perte de YAP/TAZ affectait la population de cellules progénitrices SHH+ et entraînait une dégénérescence du cortex chez l'adulte. Le phénotype observé suite à la perte de LATS1/2 chez les embryons et les souris juvéniles *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1^{cre/+}* suggère que cette même population de cellules est probablement aussi affectée dans ce modèle, ce qui laisse croire que des dérèglements de la voie Hippo (activation ou inactivation) peuvent avoir un impact important sur les cellules progénitrices. Ensemble, ces résultats permettent de conclure définitivement que la voie Hippo doit être méticuleusement régulée pour assurer la survie des cellules du cortex surrénalien et/ou le maintien de leur identité. D'autres expériences sont nécessaires pour mieux comprendre le mécanisme d'action des effecteurs de la voie Hippo, comme il sera discuté dans la prochaine section.

4.3 Limites et perspectives

Les expériences réalisées dans le cadre de ce projet ont permis de tirer d'importantes conclusions par rapport au développement adrénocortical. Cependant, le modèle transgénique utilisé et la méthodologie comportent certaines limites qui pourraient être corrigées dans des expériences futures.

Tout d'abord, il est important de considérer le degré de recombinaison génique et le moment auquel il se produit. Dans notre cas, la recombinaison de *Lats1* et *Lats2* avec le système *Cre-loxP* était relativement efficace, mais incomplète, avec une réduction de l'expression de 80% et de 62% à un jour d'âge, respectivement. Le niveau d'expression génique a été déterminé par RT-qPCR sur des glandes surrénales entières qui contenaient la médulla, où la recombinaison n'a pas eu lieu, ce qui peut expliquer en partie pourquoi l'inactivation de *Lats1/2* n'était pas de 100%. De plus, selon le gène ciblé, la recombinaison n'est pas toujours complète avec le système *Cre-lox* puisque l'état de la chromatine empêche parfois l'enzyme *Cre* d'accéder aux sites loxP. Finalement, l'inactivation de *Lats1* a débuté avant celle de *Lats2*. Il se pourrait que *Lats2* soit situé dans une région où la chromatine est moins facilement accessible par l'enzyme de recombinaison. Même si nous ignorons la proportion exacte des cellules adrénocorticales où il y a réellement eu une inactivation concomitante de *Lats1/2*, la sévérité du phénotype observé suggère que la recombinaison était suffisante pour étudier ce modèle. Pour valider l'inactivation simultanée de *Lats1/2* dans les cellules adrénocorticales, il aurait été pertinent d'évaluer l'expression de LATS1 et LATS2 par immunohistochimie. Cependant, la non-disponibilité d'anticorps commerciaux efficaces, un problème récurrent auquel font face les chercheurs étudiant la voie Hippo,

rend cette approche difficile. De manière similaire à plusieurs autres études (364, 382-385), nous avons étudié l'expression de LATS1/2 indirectement en analysant l'état de phosphorylation de YAP, la localisation cellulaire de YAP et TAZ (par immunohistochimie) et l'expression de *Lats1/2* et des gènes cibles de la voie Hippo (par RT-qPCR), ce qui a permis de conclure avec assurance que la voie Hippo était bel et bien inactivée chez les souris *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre*. L'hybridation *in situ* aurait pu être une alternative pertinente; il s'agit d'une technique permettant de détecter les transcrits d'ARNm sur une coupe histologique. Elle a permis de localiser *Lats1/2* adéquatement sur des sections paraffinées d'embryons entiers dans une étude développementale (386).

Dans notre analyse des résultats, il a été suggéré que les cellules fusiformes faisaient partie de la famille des myofibroblastes en se basant sur leur morphologie histologique et sur l'expression des marqueurs vimentin, α -SMA, calponine, caldesmon et Secreted Phosphoprotein 1. Toutefois, d'autres types cellulaires ont une apparence fusiforme et expriment ces mêmes marqueurs, comme les muscles lisses et certaines cellules myoépithéliales (387). Ultimement, la microscopie électronique aurait été le meilleur moyen de conclure sur l'identité exacte des cellules fusiformes observées dans l'adrénocortex des souris *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* puisque les myofibroblastes possèdent des caractéristiques ultrastructurales uniques. On les distingue par leur réticulum endoplasmique rugueux proéminent, leurs myofilaments périphériques, leurs jonctions fibronexus (pas de lamina) et leurs jonctions communicantes (388).

La mortalité des souris mutantes *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* vers 2 à 3 semaines d'âge est une autre limite importante de ce projet, faisant en sorte que ce modèle ne nous permet pas d'étudier le rôle de LATS1/2 dans le renouvellement post-natal de l'adrénocortex. Pour pallier l'insuffisance d'hormones stéroïdiennes produites, il aurait été possible d'administrer un traitement compensatoire à base de glucocorticoïdes et de minéralocorticoïdes (389, 390) pour prolonger la durée de vie et étudier les souris plus longtemps. Il serait aussi intéressant de créer un modèle de souris *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};AS-cre*, dans lequel *Lats1/2* seraient conditionnellement supprimés uniquement dans les cellules différenciées de la zG, AS étant l'aldostérone synthase (*Cyp11b2*). L'expression d'AS débute à la naissance et est maintenue durant toute la vie post-natale (146), donc le développement embryonnaire du cortex se déroulerait normalement. Puisque le cortex est renouvelé par un mécanisme de migration centripète, les cellules de la zF seront éventuellement remplacées complètement par des cellules dérivant de la zG, où la recombinaison a lieu, vers 3 mois chez la femelle (146) et vers 10 mois chez le mâle (169). Ceci permettrait d'étudier les conséquences de la perte de *Lats1/2* sur le maintien du cortex chez des souris adultes à long

terme. Dans le même ordre d'idées, des modèles murins transgéniques inductibles pourraient être créés pour induire la délétion de *Lats1/2* au moment voulu après le développement embryonnaire afin que la recombinaison débute dans les glandes surrénales matures. Par exemple, un modèle *AS-cre* ou *Cyp11b1-cre* inductible par le tamoxifène (CreER) ou le système *Tet-Off*, dans lequel l'expression du gène cible dépend de l'activité d'un activateur transcriptionnel inductible par la tétracycline (391), seraient de bonnes options. Par contre, de tels modèles de souris inductibles n'ont jamais été créés et ne sont donc pas actuellement disponibles.

Même si la principale fonction de LATS1/2 est de réguler l'activité de YAP/TAZ, ils jouent d'autres rôles qui en sont indépendants. Par exemple, LATS1 empêche la transition entre les phases G2 et M alors que LATS2 bloque la transition G1/S, ce qui limite la prolifération cellulaire (245, 254, 255). Ils sont aussi impliqués dans le contrôle de l'apoptose (256, 257). Une autre fonction des kinases LATS à considérer est l'inhibition de l'activité transcriptionnelle du récepteur aux androgènes (260), qui est exprimé dans la surrénale embryonnaire (392, 393). De plus, LATS1/2 peuvent bloquer l'activité de transcription du récepteur aux œstrogènes et entraîner sa dégradation (261, 262). Ce récepteur est exprimé dans toutes les zones du cortex surrénalien fœtal et les œstrogènes provenant du placenta modulent le développement morphologique et fonctionnel du cortex fœtal (394). Les expériences effectuées dans le cadre de ce mémoire ne permettent pas de déterminer si le phénotype surrénalien associé à la suppression de *Lats1/2* est uniquement causé par l'augmentation de l'activité de YAP/TAZ ou si l'inhibition des autres fonctions de LATS1/2 contribue également au phénotype observé. Afin de répondre à cette question, il serait intéressant de générer un modèle de souris dans lequel *Lats1*, *Lats2*, *Yap* et *Taz* seraient inactivés dans les tissus stéroïdiens (souris *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1-cre*). Si ces souris possèdent des glandes surrénales phénotypiquement normales (phénotype secouru), il sera possible de conclure que l'activité amplifiée de YAP/TAZ était la seule cause du phénotype observé.

Finalement, le mécanisme expliquant l'apparition de cellules myofibroblastiques dans le cortex surrénalien des souris *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* n'a pas été étudié dans ce projet, mais nous avons émis deux hypothèses pour l'expliquer. Premièrement, il est probable que les cellules adrénocorticales se transdifférencient en cellules de la famille des myofibroblastes par un processus apparenté à une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Lors d'EMT, les cellules perdent leurs propriétés épithéliales (polarité, jonctions cellulaires) et acquièrent des propriétés mésenchymateuses (capacité d'invasion et de migration), un événement qui se produit normalement dans les tumeurs, durant l'embryogenèse de certains tissus et dans la fibrose (révisé dans (395)). Les cellules adrénocorticales sont considérées comme

étant de nature épithéliale car elles expriment plusieurs marqueurs classiques (cytokératine, laminine I, collagène IV, etc. (396-399) Dans le cas présent, plusieurs résultats suggèrent une transdifférenciation. D'abord, l'apparition de cellules fusiformes dans le cortex est très rapide et il n'y a pas d'augmentation significative de la prolifération cellulaire. Aussi, le fait que StAR (acteur de la stéroïdogénèse) et vimentin (marqueur mésenchymateux) soient exprimés simultanément dans un grand nombre de cellules à un moment où CYP11B1 n'est plus exprimé évoque un phénotype transitoire, entre épithélial et mésenchymateux. Enfin, *Snail1* est un gène impliqué dans la fibrose et l'EMT (400-402), et son expression est augmentée dans les surrénales des souris *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre*. Il est rapporté que la suppression de la voie Hippo participe à la fibrose dans plusieurs tissus comme les poumons (403), les reins (404), le cœur (385) et le foie (405). Deuxièmement, il est possible que l'inactivation de *Lats1/2* altère la différenciation des cellules souches mésenchymateuses capsulaires GLI1+ en cellules adrénocorticales. Ces cellules sont recrutées pour contribuer au développement du cortex définitif et leurs descendants migrent centripètement. Le fait que les premières cellules exprimant α -SMA se trouvent dans la région sous-capsulaire concorde avec cette hypothèse. Un phénotype similaire a été observé dans le rein en formation lors de la délétion de *Lats1/2* dans les progéniteurs des néphrons, caractérisé par une accumulation de myofibroblastes dans le cortex et la médulla rénale avec dépôt de fibres de collagène. Des analyses de traçage ont révélé que les myofibroblastes provenaient de la différenciation des cellules progénitrices mésenchymateuses des néphrons (364). Un phénomène similaire pourrait donc se produire dans la glande surrénale. Puisque notre modèle transgénique ne permet pas de trancher entre ces deux hypothèses, des analyses de traçage de lignée sont requises pour aller plus loin. Un modèle de souris *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* + Gli-GFP ou Rosa^{GLI1-FLAG} pourrait être généré afin de suivre le devenir des cellules souches GLI1+ dans la capsule et déterminer si elles sont à l'origine des myofibroblastes ou non.

L'apparition de cellules ressemblant à des myofibroblastes dans le cortex surrénalien accompagnée du dépôt marqué de fibres de collagène s'apparente au processus de fibrose qui se déroule lors de dommages tissulaires chroniques, caractérisé par la synthèse excessive de matrice extracellulaire, sa contraction et son remodelage par les myofibroblastes (339). Il a récemment été démontré que les voies de signalisation Hippo, TGF- β et Wnt convergeaient à plusieurs niveaux afin de moduler l'activation et le maintien du phénotype myofibroblastique. Ces interactions touchent surtout l'activation ou l'inactivation en amont des voies, la localisation cellulaire des effecteurs et même l'activité transcriptionnelle (révisé dans (338)). Examiner ces interactions dans le modèle de souris *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre* pourrait sans doute approfondir notre compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la transdifférenciation mésenchymateuse aberrante des cellules

adrénocorticales. Pour ce faire, plusieurs techniques moléculaires peuvent être employées. Par exemple, la localisation cellulaire des effecteurs clés en aval des voies Wnt (β -caténine) et TGF- β (SMAD2/3/4) pourrait être évaluée par immunohistochimie dans le but de mettre en évidence l'état d'activation des voies. Dans la même optique, l'expression de la forme activée de la β -caténine (phosphorylée) pourrait être mise en évidence par western blot. Ensuite, il serait intéressant d'analyser l'expression des principaux gènes cibles des voies Wnt (406) et TGF- β (407) par RT-qPCR dans le cortex surrénalien. Enfin, il a été démontré que YAP/TAZ pouvaient réguler la localisation de SMAD2/3 dans la cellule en se liant directement à celles-ci (335, 408). Une technique de co-immunoprécipitation, qui permet de détecter des interactions protéine-protéine spécifique à l'aide d'anticorps, permettrait de vérifier si YAP/TAZ interagissent davantage avec SMAD2/3 chez les souris *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Nr5a1-cre*.

La délétion conditionnelle de *Lats1* et *Lats2* dans les cellules mésenchymateuses des canaux de Müller en développement (modèle de souris *Lats1^{flox/flox};Lats2^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}*) a poussé ces cellules à adopter une identité de myofibroblaste, résultant en malformations du tractus reproducteur de la femelle. Dans cette étude récente, cette différenciation a été attribuée à la surexpression de YAP/TAZ. Tout comme dans notre modèle, *Ctgf*, un gène cible de la voie Hippo, était surexprimé (409); il s'agit d'un acteur important dans l'activation et la différenciation des myofibroblastes (410, 411) et les auteurs ont suggéré que sa surexpression pourrait contribuer au phénotype observé (409). L'expression de *Ctgf* est aussi régulée par la voie TGF- β , donc nous ne pouvons pas exclure que des interactions Hippo-TGF- β soient responsables de sa surexpression dans notre modèle.

Chapitre 5 – Conclusion

Les résultats de ce projet contribuent significativement à l'avancement de nos connaissances sur le développement embryonnaire de la glande surrénale, un processus qui n'est pas encore complètement élucidé à ce jour, ainsi que sur les fonctions de la voie Hippoe. Nos expériences ont permis de découvrir que les kinases LATS1/2 de la voie Hippo jouent un rôle indispensable dans le développement du cortex surrénalien en empêchant la différenciation des cellules stéroïdogéniques en cellules de la famille des myofibroblastes, qui sont incapables de produire des hormones stéroïdiennes et qui entraînent une désorganisation sévère de l'architecture cortico-médullaire. La prochaine étape serait d'élucider l'implication de LATS1/2 dans l'homéostasie du cortex chez l'adulte et dans la stéroïdogénèse, dans l'optique de mieux comprendre les endocrinopathies surrénaliennes et même le développement de tumeurs, ce qui pourrait avoir d'importantes retombées cliniques.

Chapitre 6 – Références bibliographiques

1. Dunn TB. Normal and pathologic anatomy of the adrenal gland of the mouse, including neoplasms. *J Natl Cancer Inst.* 1970;44(6):1323-89.
2. M. Kaufman AYN, J.P. Sundberg. *Histologic basis of mouse endocrine system development: a comparative analysis*: CRC Press Taylor & Francis Group; 2009.
3. Frith CH. *Histology, adrenal gland, mouse, in Monographs on pathology of laboratory animals. Endocrine system.* Berlin: Springer-Verlag; 1983.
4. Walczak EM, Kuick R, Finco I, Bohin N, Hrycaj SM, Wellik DM, et al. Wnt signaling inhibits adrenal steroidogenesis by cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms. *Mol Endocrinol.* 2014;28(9):1471-86.
5. Romero DG, Yanes LL, de Rodriguez AF, Plonczynski MW, Welsh BL, Reckelhoff JF, et al. Disabled-2 is expressed in adrenal zona glomerulosa and is involved in aldosterone secretion. *Endocrinology.* 2007;148(6):2644-52.
6. Halder SK, Takemori H, Hatano O, Nonaka Y, Wada A, Okamoto M. Cloning of a membrane-spanning protein with epidermal growth factor-like repeat motifs from adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology.* 1998;139(7):3316-28.
7. Eberhart CG, Argani P. Wnt signaling in human development: beta-catenin nuclear translocation in fetal lung, kidney, placenta, capillaries, adrenal, and cartilage. *Pediatr Dev Pathol.* 2001;4(4):351-7.
8. Gomez-Sanchez CE, Qi X, Velarde-Miranda C, Plonczynski MW, Parker CR, Rainey W, et al. Development of monoclonal antibodies against human CYP11B1 and CYP11B2. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;383(1-2):111-7.
9. Aigueperse C, Martinez A, Lefrancois-Martinez AM, Veyssiere G, Jean Cl. Cyclic AMP regulates expression of the gene coding for a mouse vas deferens protein related to the aldo-keto reductase superfamily in human and murine adrenocortical cells. *J Endocrinol.* 1999;160(1):147-54.
10. Zubair M, Ishihara S, Oka S, Okumura K, Morohashi K. Two-step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development: initiation by a Hox-Pbx1-Prep1 complex and maintenance via autoregulation by Ad4BP/SF-1. *Mol Cell Biol.* 2006;26(11):4111-21.
11. Sato T. The fine structure of the mouse adrenal X zone. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1968;87(3):315-29.
12. Hershkovitz L, Beuschlein F, Klammer S, Krup M, Weinstein Y. Adrenal 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the mouse catabolizes progesterone and 11-deoxycorticosterone and is restricted to the X-zone. *Endocrinology.* 2007;148(3):976-88.
13. Hirokawa N, Ishikawa H. Electron microscopic observations on the castration-induced X zone in the adrenal cortex of male mice. *Cell Tissue Res.* 1975;162(1):119-30.
14. Y T. Structural changes in the suprarenal gland of the mouse during pregnancy. *Journal of Experimental Biology.* 1926;4:81-92.
15. E H-M. A transitory zone in the adrenal cortex which shows age and sex relationships. *American Journal of Anatomy.* 1927;40:251-93.
16. Jones IC. The disappearance of the X zone of the mouse adrenal cortex during first pregnancy. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1952;139(896):398-410.
17. Pihlajoki M, Dorner J, Cochran RS, Heikinheimo M, Wilson DB. Adrenocortical zonation, renewal, and remodeling. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015;6:27.

18. Rhodin JA. The ultrastructure of the adrenal cortex of the rat under normal and experimental conditions. *J Ultrastruct Res.* 1971;34(1):23-71.
19. Nyska AaM, R.R. The adrenal gland, in *Pathology of the Mouse, Reference and Atlas*. Vienna: Cache River Press; 1999.
20. La Perle KMaJ, C.D. Endocrine System, in *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*. Amsterdam: Elsevier Inc.; 2012.
21. Pihlajoki M HM, Wilson DB. Regulation of Adrenal Steroidogenesis. In: Levine A. (eds) *Adrenal Disorders*: Humana Press, Cham; 2018.
22. Spat A, Hunyady L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev.* 2004;84(2):489-539.
23. Tobian L. Interrelationship of electrolytes, juxtaglomerular cells and hypertension. *Physiol Rev.* 1960;40:280-312.
24. Ganong WF, Biglieri EG, Mulrow PJ. Mechanisms regulating adrenocortical secretion of aldosterone and glucocorticoids. *Recent Prog Horm Res.* 1966;22:381-430.
25. W MPG. Stimulation of aldosterone secretion by angiotensin II. *Yale J Biol Med.* 1960;33:386.
26. Loffing J, Korbmayer C. Regulated sodium transport in the renal connecting tubule (CNT) via the epithelial sodium channel (ENaC). *Pflugers Arch.* 2009;458(1):111-35.
27. Funder JW, Pearce PT, Smith R, Campbell J. Vascular type I aldosterone binding sites are physiological mineralocorticoid receptors. *Endocrinology.* 1989;125(4):2224-6.
28. Caprio M, Newfell BG, la Sala A, Baur W, Fabbri A, Rosano G, et al. Functional mineralocorticoid receptors in human vascular endothelial cells regulate intercellular adhesion molecule-1 expression and promote leukocyte adhesion. *Circ Res.* 2008;102(11):1359-67.
29. Lombes M, Oblin ME, Gasc JM, Baulieu EE, Farman N, Bonvalet JP. Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res.* 1992;71(3):503-10.
30. Jaffe IZ, Mendelsohn ME. Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res.* 2005;96(6):643-50.
31. Nishiyama A, Yao L, Fan Y, Kyaw M, Kataoka N, Hashimoto K, et al. Involvement of aldosterone and mineralocorticoid receptors in rat mesangial cell proliferation and deformability. *Hypertension.* 2005;45(4):710-6.
32. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond).* 1998;94(6):557-72.
33. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 2000;21(1):55-89.
34. Franchimont D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1024:124-37.
35. Mastorakos G, Scopa CD, Kao LC, Vryonidou A, Friedman TC, Kattis D, et al. Presence of immunoreactive corticotropin-releasing hormone in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(3):1046-50.
36. Whirledge SD, Oakley RH, Myers PH, Lydon JP, DeMayo F, Cidlowski JA. Uterine glucocorticoid receptors are critical for fertility in mice through control of embryo implantation and decidualization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(49):15166-71.
37. Lockwood CJ, Radunovic N, Nastic D, Petkovic S, Aigner S, Berkowitz GS. Corticotropin-releasing hormone and related pituitary-adrenal axis hormones in fetal and maternal blood during the second half of pregnancy. *J Perinat Med.* 1996;24(3):243-51.
38. Mesiano S, Jaffe RB. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev.* 1997;18(3):378-403.

39. Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Kriegstein K, Schmid W, Aguzzi A, et al. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* 1995;9(13):1608-21.
40. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev.* 2011;32(1):81-151.
41. Davison SL, Bell R. Androgen physiology. *Semin Reprod Med.* 2006;24(2):71-7.
42. Rainey WE, Nakamura Y. Regulation of the adrenal androgen biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;108(3-5):281-6.
43. Tank AW, Lee Wong D. Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Compr Physiol.* 2015;5(1):1-15.
44. Gwynne JT, Strauss JF, 3rd. The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev.* 1982;3(3):299-329.
45. Miller W.L. GDH, Rosen M. Ovarian and Adrenal Androgen Biosynthesis and Metabolism. In: Azziz R., Nestler J.E., Dewailly D. : Humana Press; 2006.
46. Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans.* 2002;30(Pt 6):1091-5.
47. Capponi AM. Regulation of cholesterol supply for mineralocorticoid biosynthesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13(3):118-21.
48. Vanier MT. Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C. *J Inherit Metab Dis.* 2015;38(1):187-99.
49. Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem.* 1994;269(33):21003-9.
50. Connelly MA, Kellner-Weibel G, Rothblat GH, Williams DL. SR-BI-directed HDL-cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res.* 2003;44(2):331-41.
51. Kraemer FB, Shen WJ, Harada K, Patel S, Osuga J, Ishibashi S, et al. Hormone-sensitive lipase is required for high-density lipoprotein cholesteryl ester-supported adrenal steroidogenesis. *Mol Endocrinol.* 2004;18(3):549-57.
52. Gwynne JT, Hess B. The role of high density lipoproteins in rat adrenal cholesterol metabolism and steroidogenesis. *J Biol Chem.* 1980;255(22):10875-83.
53. Shen WJ, Patel S, Natu V, Hong R, Wang J, Azhar S, et al. Interaction of hormone-sensitive lipase with steroidogenic acute regulatory protein: facilitation of cholesterol transfer in adrenal. *J Biol Chem.* 2003;278(44):43870-6.
54. Crivello JF, Jefcoate CR. Intracellular movement of cholesterol in rat adrenal cells. Kinetics and effects of inhibitors. *J Biol Chem.* 1980;255(17):8144-51.
55. Rone MB, Fan J, Papadopoulos V. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791(7):646-58.
56. Rone MB, Midzak AS, Issop L, Rammouz G, Jagannathan S, Fan J, et al. Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones. *Mol Endocrinol.* 2012;26(11):1868-82.
57. Pon LA, Hartigan JA, Orme-Johnson NR. Acute ACTH regulation of adrenal corticosteroid biosynthesis. Rapid accumulation of a phosphoprotein. *J Biol Chem.* 1986;261(28):13309-16.
58. Pon LA, Orme-Johnson NR. Acute stimulation of corpus luteum cells by gonadotrophin or adenosine 3',5'-monophosphate causes accumulation of a phosphoprotein concurrent with acceleration of steroid synthesis. *Endocrinology.* 1988;123(4):1942-8.
59. Duarte A, Castillo AF, Podesta EJ, Poderoso C. Mitochondrial fusion and ERK activity regulate steroidogenic acute regulatory protein localization in mitochondria. *PLoS One.* 2014;9(6):e100387.

60. Hasegawa T, Zhao L, Caron KM, Majdic G, Suzuki T, Shizawa S, et al. Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice. *Mol Endocrinol.* 2000;14(9):1462-71.
61. Bose HS, Sugawara T, Strauss JF, 3rd, Miller WL, International Congenital Lipoid Adrenal Hyperplasia C. The pathophysiology and genetics of congenital lipoid adrenal hyperplasia. *N Engl J Med.* 1996;335(25):1870-8.
62. Strauss JF, Modi B, McAllister JM. Chapter 18 - Defects in Ovarian Steroid Hormone Biosynthesis. *Cellular Endocrinology in Health and Disease: Elsevier;* 2014. p. 285-309.
63. Miller WL, Bose HS. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *J Lipid Res.* 2011;52(12):2111-35.
64. Koritz SB, Kumar AM. On the mechanism of action of the adrenocorticotrophic hormone. The stimulation of the activity of enzymes involved in pregnenolone synthesis. *J Biol Chem.* 1970;245(1):152-9.
65. Lefrancois-Martinez AM, Tournaire C, Martinez A, Berger M, Daoudal S, Tritsch D, et al. Product of side-chain cleavage of cholesterol, isocaproaldehyde, is an endogenous specific substrate of mouse vas deferens protein, an aldose reductase-like protein in adrenocortical cells. *J Biol Chem.* 1999;274(46):32875-80.
66. Pastel E, Pointud JC, Martinez A, Lefrancois-Martinez AM. Aldo-Keto Reductases 1B in Adrenal Cortex Physiology. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7:97.
67. Lachance Y, Luu-The V, Labrie C, Simard J, Dumont M, de Launoit Y, et al. Characterization of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase gene and its expression in mammalian cells. *J Biol Chem.* 1990;265(33):20469-75.
68. Turcu AF, Auchus RJ. Adrenal Steroidogenesis and Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2016;44(2):275-96.
69. Keeney DS, Jenkins CM, Waterman MR. Developmentally regulated expression of adrenal 17 alpha-hydroxylase cytochrome P450 in the mouse embryo. *Endocrinology.* 1995;136(11):4872-9.
70. Auchus RJ, Lee TC, Miller WL. Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. *J Biol Chem.* 1998;273(6):3158-65.
71. Strott CA. Sulfonation and molecular action. *Endocr Rev.* 2002;23(5):703-32.
72. Turcu AF, Auchus RJ. Adrenal steroidogenesis and congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2015;44(2):275-96.
73. Hatano O, Takakusu A, Nomura M, Morohashi K. Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Genes Cells.* 1996;1(7):663-71.
74. Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol.* 1994;8(5):654-62.
75. Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell.* 1994;77(4):481-90.
76. Morohashi K. The ontogenesis of the steroidogenic tissues. *Genes Cells.* 1997;2(2):95-106.
77. Anderson DJ, Axel R. A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. *Cell.* 1986;47(6):1079-90.
78. UU U. The early embryological development of the fetal and permanent adrenal cortex in man. *The Anatomical Record.* 1940;76:183-203.
79. Zubair M, Parker KL, Morohashi K. Developmental links between the fetal and adult zones of the adrenal cortex revealed by lineage tracing. *Mol Cell Biol.* 2008;28(23):7030-40.
80. Val P, Martinez-Barbera JP, Swain A. Adrenal development is initiated by Cited2 and Wt1 through modulation of Sf-1 dosage. *Development.* 2007;134(12):2349-58.

81. Schulte DM, Shapiro I, Reincke M, Beuschlein F. Expression and spatio-temporal distribution of differentiation and proliferation markers during mouse adrenal development. *Gene Expr Patterns*. 2007;7(1-2):72-81.
82. King P, Paul A, Laufer E. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(50):21185-90.
83. Mitani F, Mukai K, Ogawa T, Miyamoto H, Ishimura Y. Expression of cytochromes P450ald and P45011 beta in rat adrenal gland during late gestational and neonatal stages. *Steroids*. 1997;62(1):57-61.
84. Xing Y, Lerario AM, Rainey W, Hammer GD. Development of adrenal cortex zonation. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2015;44(2):243-74.
85. Sadovsky Y, Crawford PA, Woodson KG, Polish JA, Clements MA, Tourtellotte LM, et al. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(24):10939-43.
86. Ikeda Y, Lala DS, Luo X, Kim E, Moisan MP, Parker KL. Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol Endocrinol*. 1993;7(7):852-60.
87. Val P, Lefrancois-Martinez AM, Veysièrè G, Martinez A. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl Recept*. 2003;1(1):8.
88. Bland ML, Fowkes RC, Ingraham HA. Differential requirement for steroidogenic factor-1 gene dosage in adrenal development versus endocrine function. *Mol Endocrinol*. 2004;18(4):941-52.
89. Park SY, Meeks JJ, Raverot G, Pfaff LE, Weiss J, Hammer GD, et al. Nuclear receptors Sf1 and Dax1 function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development. *Development*. 2005;132(10):2415-23.
90. Fatchiyah, Zubair M, Shima Y, Oka S, Ishihara S, Fukui-Katoh Y, et al. Differential gene dosage effects of Ad4BP/SF-1 on target tissue development. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341(4):1036-45.
91. Bamforth SD, Braganca J, Eloranta JJ, Murdoch JN, Marques FI, Kranc KR, et al. Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking Cited2, a new Tfap2 co-activator. *Nat Genet*. 2001;29(4):469-74.
92. Bamforth SD, Braganca J, Farthing CR, Schneider JE, Broadbent C, Michell AC, et al. Cited2 controls left-right patterning and heart development through a Nodal-Pitx2c pathway. *Nat Genet*. 2004;36(11):1189-96.
93. Cui S, Ross A, Stallings N, Parker KL, Capel B, Quaggin SE. Disrupted gonadogenesis and male-to-female sex reversal in Pod1 knockout mice. *Development*. 2004;131(16):4095-105.
94. Lalli E, Sassone-Corsi P. DAX-1, an unusual orphan receptor at the crossroads of steroidogenic function and sexual differentiation. *Mol Endocrinol*. 2003;17(8):1445-53.
95. Val P, Swain A. Gene dosage effects and transcriptional regulation of early mammalian adrenal cortex development. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;323(1):105-14.
96. Scheys JO, Heaton JH, Hammer GD. Evidence of adrenal failure in aging Dax1-deficient mice. *Endocrinology*. 2011;152(9):3430-9.
97. Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum Mol Genet*. 2006;15 Spec No 2:R196-201.
98. Bandiera R, Vidal VP, Motamedi FJ, Clarkson M, Sahut-Barnola I, von Gise A, et al. WT1 maintains adrenal-gonadal primordium identity and marks a population of AGP-like progenitors within the adrenal gland. *Dev Cell*. 2013;27(1):5-18.
99. Wilhelm D, Englert C. The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev*. 2002;16(14):1839-51.
100. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, et al. WT-1 is required for early kidney development. *Cell*. 1993;74(4):679-91.

101. Franca MM, Ferraz-de-Souza B, Santos MG, Lerario AM, Fragoso MC, Latronico AC, et al. POD-1 binding to the E-box sequence inhibits SF-1 and StAR expression in human adrenocortical tumor cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;371(1-2):140-7.
102. Tamura M, Kanno Y, Chuma S, Saito T, Nakatsuji N. Pod-1/Capsulin shows a sex- and stage-dependent expression pattern in the mouse gonad development and represses expression of Ad4BP/SF-1. *Mech Dev.* 2001;102(1-2):135-44.
103. Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature.* 2008;454(7200):109-13.
104. Bielinska M, Parviainen H, Porter-Tinge SB, Kiiveri S, Genova E, Rahman N, et al. Mouse strain susceptibility to gonadectomy-induced adrenocortical tumor formation correlates with the expression of GATA-4 and luteinizing hormone receptor. *Endocrinology.* 2003;144(9):4123-33.
105. Woolley GW, Dickie MM, Little CC. Adrenal tumors and other pathological changes in reciprocal crosses in mice. I. Strain DBA x strain CE and the reciprocal. *Cancer Res.* 1952;12(2):142-52.
106. Bielinska M, Genova E, Boime I, Parviainen H, Kiiveri S, Leppaluoto J, et al. Gonadotropin-induced adrenocortical neoplasia in NU/J nude mice. *Endocrinology.* 2005;146(9):3975-84.
107. Johnsen IK, Slawik M, Shapiro I, Hartmann MF, Wudy SA, Looyenga BD, et al. Gonadectomy in mice of the inbred strain CE/J induces proliferation of sub-capsular adrenal cells expressing gonadal marker genes. *J Endocrinol.* 2006;190(1):47-57.
108. Kero J, Poutanen M, Zhang FP, Rahman N, McNicol AM, Nilson JH, et al. Elevated luteinizing hormone induces expression of its receptor and promotes steroidogenesis in the adrenal cortex. *J Clin Invest.* 2000;105(5):633-41.
109. Halt K, Vainio S. Coordination of kidney organogenesis by Wnt signaling. *Pediatr Nephrol.* 2014;29(4):737-44.
110. Potok MA, Cha KB, Hunt A, Brinkmeier ML, Leitges M, Kispert A, et al. WNT signaling affects gene expression in the ventral diencephalon and pituitary gland growth. *Dev Dyn.* 2008;237(4):1006-20.
111. Prunskaitė-Hyyryläinen R, Skovorodkin I, Xu Q, Miinalainen I, Shan J, Vainio SJ. Wnt4 coordinates directional cell migration and extension of the Mullerian duct essential for ontogenesis of the female reproductive tract. *Hum Mol Genet.* 2016;25(6):1059-73.
112. Bothun AM, Woods DC. Dynamics of WNT signaling components in the human ovary from development to adulthood. *Histochem Cell Biol.* 2019;151(2):115-23.
113. Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell.* 2012;149(6):1192-205.
114. Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Jousineau C, Damon-Soubeyrand C, Louiset E, et al. Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet.* 2010;19(8):1561-76.
115. Kim AC, Reuter AL, Zubair M, Else T, Serecky K, Bingham NC, et al. Targeted disruption of beta-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. *Development.* 2008;135(15):2593-602.
116. Pignatti E, Leng S, Carlone DL, Breault DT. Regulation of zonation and homeostasis in the adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;441:146-55.
117. Vidal V, Sacco S, Rocha AS, da Silva F, Panzolini C, Dumontet T, et al. The adrenal capsule is a signaling center controlling cell renewal and zonation through Rspo3. *Genes Dev.* 2016;30(12):1389-94.
118. Kim M, Jho EH. Cross-talk between Wnt/beta-catenin and Hippo signaling pathways: a brief review. *BMB Rep.* 2014;47(10):540-5.
119. Heikkilä M, Peltoketo H, Leppaluoto J, Ilves M, Vuolteenaho O, Vainio S. Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production. *Endocrinology.* 2002;143(11):4358-65.
120. Yu RN, Ito M, Saunders TL, Camper SA, Jameson JL. Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat Genet.* 1998;20(4):353-7.

121. Wood MA, Acharya A, Finco I, Swonger JM, Elston MJ, Tallquist MD, et al. Fetal adrenal capsular cells serve as progenitor cells for steroidogenic and stromal adrenocortical cell lineages in *M. musculus*. *Development*. 2013;140(22):4522-32.
122. Simon DP, Hammer GD. Adrenocortical stem and progenitor cells: implications for adrenocortical carcinoma. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;351(1):2-11.
123. McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol*. 2003;53:1-114.
124. King PJ, Guasti L, Laufer E. Hedgehog signalling in endocrine development and disease. *J Endocrinol*. 2008;198(3):439-50.
125. Gupta S, Takebe N, Lorusso P. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2010;2(4):237-50.
126. Ingham PW, Nakano Y, Seger C. Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat Rev Genet*. 2011;12(6):393-406.
127. Allen BL, Song JY, Izzi L, Althaus IW, Kang JS, Charron F, et al. Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function. *Dev Cell*. 2011;20(6):775-87.
128. Izzi L, Levesque M, Morin S, Laniel D, Wilkes BC, Mille F, et al. Boc and Gas1 each form distinct Shh receptor complexes with Ptch1 and are required for Shh-mediated cell proliferation. *Dev Cell*. 2011;20(6):788-801.
129. Bai CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D, Joyner AL. Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development*. 2002;129(20):4753-61.
130. Ahn S, Joyner AL. Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell*. 2004;118(4):505-16.
131. Rimkus TK, Carpenter RL, Qasem S, Chan M, Lo HW. Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers (Basel)*. 2016;8(2).
132. Laufer E, Kesper D, Vortkamp A, King P. Sonic hedgehog signaling during adrenal development. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;351(1):19-27.
133. Long F, Zhang XM, Karp S, Yang Y, McMahon AP. Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development*. 2001;128(24):5099-108.
134. Ching S, Vilain E. Targeted disruption of Sonic Hedgehog in the mouse adrenal leads to adrenocortical hypoplasia. *Genesis*. 2009;47(9):628-37.
135. Huang CC, Miyagawa S, Matsumaru D, Parker KL, Yao HH. Progenitor cell expansion and organ size of mouse adrenal is regulated by sonic hedgehog. *Endocrinology*. 2010;151(3):1119-28.
136. Goodrich LV, Johnson RL, Milenkovic L, McMahon JA, Scott MP. Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev*. 1996;10(3):301-12.
137. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol*. 2001;2(3):REVIEWS3005.
138. Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem*. 2006;281(23):15694-700.
139. Lavine KJ, Yu K, White AC, Zhang X, Smith C, Partanen J, et al. Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation in vivo. *Dev Cell*. 2005;8(1):85-95.
140. Crickard K, III CR, Jaffe RB. Control of proliferation of human fetal adrenal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 1981;53(4):790-6.
141. Guasti L, Candy Sze WC, McKay T, Grose R, King PJ. FGF signalling through Fgfr2 isoform IIIb regulates adrenal cortex development. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;371(1-2):182-8.

142. Zaytouni T, Efimenko EE, Tevosian SG. GATA transcription factors in the developing reproductive system. *Adv Genet.* 2011;76:93-134.
143. Cantor AB, Orkin SH. Coregulation of GATA factors by the Friend of GATA (FOG) family of multitype zinc finger proteins. *Semin Cell Dev Biol.* 2005;16(1):117-28.
144. Tevosian SG, Jimenez E, Hatch HM, Jiang T, Morse DA, Fox SC, et al. Adrenal Development in Mice Requires GATA4 and GATA6 Transcription Factors. *Endocrinology.* 2015;156(7):2503-17.
145. Val P, Jeays-Ward K, Swain A. Identification of a novel population of adrenal-like cells in the mammalian testis. *Dev Biol.* 2006;299(1):250-6.
146. Freedman BD, Kempna PB, Carlone DL, Shah M, Guagliardo NA, Barrett PQ, et al. Adrenocortical zonation results from lineage conversion of differentiated zona glomerulosa cells. *Dev Cell.* 2013;26(6):666-73.
147. Drelon C, Berthon A, Mathieu M, Martinez A, Val P. Adrenal cortex tissue homeostasis and zonation: A WNT perspective. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;408:156-64.
148. Berthon A, Drelon C, Ragazzon B, Boulkroun S, Tissier F, Amar L, et al. WNT/beta-catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. *Hum Mol Genet.* 2014;23(4):889-905.
149. Deane HW, Shaw JH, Greep RO. The effect of altered sodium or potassium intake on the width and cytochemistry of the zona glomerulosa of the rat's adrenal cortex. *Endocrinology.* 1948;43(3):133-53.
150. McEwan PE, Vinson GP, Kenyon CJ. Control of adrenal cell proliferation by AT1 receptors in response to angiotensin II and low-sodium diet. *Am J Physiol.* 1999;276(2):E303-9.
151. Nishimoto K, Harris RB, Rainey WE, Seki T. Sodium deficiency regulates rat adrenal zona glomerulosa gene expression. *Endocrinology.* 2014;155(4):1363-72.
152. Shelton JH, Jones AL. The fine structure of the mouse adrenal cortex and the ultrastructural changes in the zona glomerulosa with low and high sodium diets. *Anat Rec.* 1971;170(2):147-81.
153. McNeill H, Whitworth E, Vinson GP, Hinson JP. Distribution of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in the rat adrenal and their activation by angiotensin II. *J Endocrinol.* 2005;187(1):149-57.
154. Bhandaru M, Kempe DS, Rotte A, Rexhepaj R, Kuhl D, Lang F. Hyperaldosteronism, hypervolemia, and increased blood pressure in mice expressing defective APC. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;297(3):R571-5.
155. Fearon ER, Spence JR. Cancer biology: a new RING to Wnt signaling. *Curr Biol.* 2012;22(19):R849-51.
156. Hao HX, Xie Y, Zhang Y, Charlat O, Oster E, Avello M, et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature.* 2012;485(7397):195-200.
157. Basham KJ, Rodriguez S, Turcu AF, Lerario AM, Logan CY, Rysztak MR, et al. A ZNRF3-dependent Wnt/beta-catenin signaling gradient is required for adrenal homeostasis. *Genes Dev.* 2019;33(3-4):209-20.
158. Lum L, Clevers H. Cell biology. The unusual case of Porcupine. *Science.* 2012;337(6097):922-3.
159. Lefkowitz RJ, Roth J, Pricer W, Pastan I. ACTH receptors in the adrenal: specific binding of ACTH-125I and its relation to adenyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1970;65(3):745-52.
160. Lehoux JG, Fleury A, Ducharme L. The acute and chronic effects of adrenocorticotropin on the levels of messenger ribonucleic acid and protein of steroidogenic enzymes in rat adrenal in vivo. *Endocrinology.* 1998;139(9):3913-22.
161. Metherell LA, Chapple JP, Cooray S, David A, Becker C, Ruschendorf F, et al. Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nat Genet.* 2005;37(2):166-70.
162. Kim C, Xuong NH, Taylor SS. Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIalpha) subunits of PKA. *Science.* 2005;307(5710):690-6.

163. Kim C, Cheng CY, Saldanha SA, Taylor SS. PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. *Cell*. 2007;130(6):1032-43.
164. Peri A, Luciani P, Conforti B, Baglioni-Peri S, Cioppi F, Crescioli C, et al. Variable expression of the transcription factors cAMP response element-binding protein and inducible cAMP early repressor in the normal adrenal cortex and in adrenocortical adenomas and carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(11):5443-9.
165. Clark AJ, Weber A. Adrenocorticotropin insensitivity syndromes. *Endocr Rev*. 1998;19(6):828-43.
166. Chida D, Nakagawa S, Nagai S, Sagara H, Katsumata H, Imaki T, et al. Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(46):18205-10.
167. Sahut-Barnola I, de Jossineau C, Val P, Lambert-Langlais S, Damon C, Lefrancois-Martinez AM, et al. Cushing's syndrome and fetal features resurgence in adrenal cortex-specific Prkar1a knockout mice. *PLoS Genet*. 2010;6(6):e1000980.
168. Finco I, Lerario AM, Hammer GD. Sonic Hedgehog and WNT Signaling Promote Adrenal Gland Regeneration in Male Mice. *Endocrinology*. 2018;159(2):579-96.
169. Grabek A, Dolfi B, Klein B, Jian-Motamedi F, Chaboissier MC, Schedl A. The Adult Adrenal Cortex Undergoes Rapid Tissue Renewal in a Sex-Specific Manner. *Cell Stem Cell*. 2019;25(2):290-6 e2.
170. Dumontet T, Sahut-Barnola I, Septier A, Montanier N, Plotton I, Roucher-Boulez F, et al. PKA signaling drives reticularis differentiation and sexually dimorphic adrenal cortex renewal. *JCI Insight*. 2018;3(2).
171. Frucci E, Taylor M, Ullenbruch M, Rainey W. SAT-LB062 Adrenal Sexual Dimorphism Is Abolished by Tissue-Targeted Deletion of the Androgen Receptor. *Journal of the Endocrine Society*. 2019;3(Supplement_1).
172. Bielohuby M, Herbach N, Wanke R, Maser-Gluth C, Beuschlein F, Wolf E, et al. Growth analysis of the mouse adrenal gland from weaning to adulthood: time- and gender-dependent alterations of cell size and number in the cortical compartment. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(1):E139-46.
173. Malendowicz LK. Sex differences in adrenocortical structure and function. XXIV. Comparative morphometric studies on adrenal cortex of intact mature male and female rats of different strains. *Cell Tissue Res*. 1987;249(2):443-9.
174. Spinedi E, Suescun MO, Hadid R, Daneva T, Gaillard RC. Effects of gonadectomy and sex hormone therapy on the endotoxin-stimulated hypothalamo-pituitary-adrenal axis: evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. *Endocrinology*. 1992;131(5):2430-6.
175. Mukai T, Kusaka M, Kawabe K, Goto K, Nawata H, Fujieda K, et al. Sexually dimorphic expression of Dax-1 in the adrenal cortex. *Genes Cells*. 2002;7(7):717-29.
176. El Wakil A, Mari B, Barhanin J, Lalli E. Genomic analysis of sexual dimorphism of gene expression in the mouse adrenal gland. *Horm Metab Res*. 2013;45(12):870-3.
177. Steffensen C, Bak AM, Rubeck KZ, Jorgensen JO. Epidemiology of Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology*. 2010;92 Suppl 1:1-5.
178. Ten S, New M, Maclaren N. Clinical review 130: Addison's disease 2001. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(7):2909-22.
179. Audenet F, Mejean A, Chartier-Kastler E, Roupret M. Adrenal tumours are more predominant in females regardless of their histological subtype: a review. *World J Urol*. 2013;31(5):1037-43.
180. Ayala-Ramirez M, Jasim S, Feng L, Ejaz S, Deniz F, Busaidy N, et al. Adrenocortical carcinoma: clinical outcomes and prognosis of 330 patients at a tertiary care center. *Eur J Endocrinol*. 2013;169(6):891-9.
181. Bornstein SR, Gonzalez-Hernandez JA, Ehrhart-Bornstein M, Adler G, Scherbaum WA. Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78(1):225-32.

182. Wurtman RJ, Axelrod J. Adrenaline synthesis: control by the pituitary gland and adrenal glucocorticoids. *Science*. 1965;150(3702):1464-5.
183. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev*. 1998;19(2):101-43.
184. Soto-Pina AE, Franklin C, Rani CS, Gottlieb H, Hinojosa-Laborde C, Strong R. A Novel Model of Dexamethasone-Induced Hypertension: Use in Investigating the Role of Tyrosine Hydroxylase. *J Pharmacol Exp Ther*. 2016;358(3):528-36.
185. Seidl K, Unsicker K. Survival and neuritic growth of sympathoadrenal (chromaffin) precursor cells in vitro. *Int J Dev Neurosci*. 1989;7(5):465-73.
186. Finotto S, Krieglstein K, Schober A, Deimling F, Lindner K, Bruhl B, et al. Analysis of mice carrying targeted mutations of the glucocorticoid receptor gene argues against an essential role of glucocorticoid signalling for generating adrenal chromaffin cells. *Development*. 1999;126(13):2935-44.
187. Bornstein SR, Tajima T, Eisenhofer G, Haidan A, Aguilera G. Adrenomedullary function is severely impaired in 21-hydroxylase-deficient mice. *FASEB J*. 1999;13(10):1185-94.
188. Yoshida-Hiroi M, Bradbury MJ, Eisenhofer G, Hiroi N, Vale WW, Novotny GE, et al. Chromaffin cell function and structure is impaired in corticotropin-releasing hormone receptor type 1-null mice. *Mol Psychiatry*. 2002;7(9):967-74.
189. Eiden LE, Jiang SZ. What's New in Endocrinology: The Chromaffin Cell. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:711.
190. Haidan A, Bornstein SR, Glasow A, Uhlmann K, Lubke C, Ehrhart-Bornstein M. Basal steroidogenic activity of adrenocortical cells is increased 10-fold by coculture with chromaffin cells. *Endocrinology*. 1998;139(2):772-80.
191. Bornstein SR, Tian H, Haidan A, Bottner A, Hiroi N, Eisenhofer G, et al. Deletion of tyrosine hydroxylase gene reveals functional interdependence of adrenocortical and chromaffin cell system in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(26):14742-7.
192. Justice RW, Zilian O, Woods DF, Noll M, Bryant PJ. 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*. 1995;9(5):534-46.
193. Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the Drosophila lats gene encodes a putative protein kinase. *Development*. 1995;121(4):1053-63.
194. Harvey KF, Pflieger CM, Hariharan IK. The Drosophila Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell*. 2003;114(4):457-67.
195. Pantalacci S, Tapon N, Leopold P. The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in Drosophila. *Nat Cell Biol*. 2003;5(10):921-7.
196. Wu S, Huang J, Dong J, Pan D. hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell*. 2003;114(4):445-56.
197. Jia J, Zhang W, Wang B, Trinko R, Jiang J. The Drosophila Ste20 family kinase dMST functions as a tumor suppressor by restricting cell proliferation and promoting apoptosis. *Genes Dev*. 2003;17(20):2514-9.
198. Tapon N, Harvey KF, Bell DW, Wahrer DC, Schiripo TA, Haber D, et al. salvador Promotes both cell cycle exit and apoptosis in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines. *Cell*. 2002;110(4):467-78.
199. Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. *Cell*. 2005;122(3):421-34.
200. Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, Comerford SA, et al. Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell*. 2007;130(6):1120-33.
201. Oh H, Irvine KD. In vivo regulation of Yorkie phosphorylation and localization. *Development*. 2008;135(6):1081-8.

202. Wu S, Liu Y, Zheng Y, Dong J, Pan D. The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev Cell*. 2008;14(3):388-98.
203. Zhang L, Ren F, Zhang Q, Chen Y, Wang B, Jiang J. The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Dev Cell*. 2008;14(3):377-87.
204. Zhao B, Li L, Lei Q, Guan KL. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev*. 2010;24(9):862-74.
205. Praskova M, Xia F, Avruch J. MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. *Curr Biol*. 2008;18(5):311-21.
206. Hergovich A, Schmitz D, Hemmings BA. The human tumour suppressor LATS1 is activated by human MOB1 at the membrane. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345(1):50-8.
207. Chan EH, Nousiainen M, Chalamalasetty RB, Schafer A, Nigg EA, Sillje HH. The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene*. 2005;24(12):2076-86.
208. Chow A, Hao Y, Yang X. Molecular characterization of human homologs of yeast MOB1. *Int J Cancer*. 2010;126(9):2079-89.
209. Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev*. 2007;21(21):2747-61.
210. Zhao B, Li L, Tumaneng K, Wang CY, Guan KL. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev*. 2010;24(1):72-85.
211. Liu CY, Zha ZY, Zhou X, Zhang H, Huang W, Zhao D, et al. The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF{beta}-TrCP E3 ligase. *J Biol Chem*. 2010;285(48):37159-69.
212. Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev*. 2008;22(14):1962-71.
213. Zhang H, Liu CY, Zha ZY, Zhao B, Yao J, Zhao S, et al. TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem*. 2009;284(20):13355-62.
214. Zhang W, Gao Y, Li P, Shi Z, Guo T, Li F, et al. VGLL4 functions as a new tumor suppressor in lung cancer by negatively regulating the YAP-TEAD transcriptional complex. *Cell Res*. 2014;24(3):331-43.
215. Strano S, Munarriz E, Rossi M, Castagnoli L, Shaul Y, Sacchi A, et al. Physical interaction with Yes-associated protein enhances p73 transcriptional activity. *J Biol Chem*. 2001;276(18):15164-73.
216. Komuro A, Nagai M, Navin NE, Sudol M. WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus. *J Biol Chem*. 2003;278(35):33334-41.
217. Zagurovskaya M, Shareef MM, Das A, Reeves A, Gupta S, Sudol M, et al. EGR-1 forms a complex with YAP-1 and upregulates Bax expression in irradiated prostate carcinoma cells. *Oncogene*. 2009;28(8):1121-31.
218. Qiao Y, Lin SJ, Chen Y, Voon DC, Zhu F, Chuang LS, et al. RUNX3 is a novel negative regulator of oncogenic TEAD-YAP complex in gastric cancer. *Oncogene*. 2016;35(20):2664-74.
219. Ferrigno O, Lallemand F, Verrecchia F, L'Hoste S, Camonis J, Atfi A, et al. Yes-associated protein (YAP65) interacts with Smad7 and potentiates its inhibitory activity against TGF-beta/Smad signaling. *Oncogene*. 2002;21(32):4879-84.
220. Murakami M, Nakagawa M, Olson EN, Nakagawa O. A WW domain protein TAZ is a critical coactivator for TBX5, a transcription factor implicated in Holt-Oram syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(50):18034-9.
221. Shao D, Zhai P, Del Re DP, Sciarretta S, Yabuta N, Nojima H, et al. A functional interaction between Hippo-YAP signalling and FoxO1 mediates the oxidative stress response. *Nat Commun*. 2014;5:3315.
222. Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev*. 2014;94(4):1287-312.

223. Avruch J, Zhou D, Fitamant J, Bardeesy N, Mou F, Barrufet LR. Protein kinases of the Hippo pathway: regulation and substrates. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23(7):770-84.
224. Yabuta N, Fujii T, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Nishiguchi H, et al. Structure, expression, and chromosome mapping of LATS2, a mammalian homologue of the *Drosophila* tumor suppressor gene *lats/warts*. *Genomics.* 2000;63(2):263-70.
225. Yabuta N, Mukai S, Okamoto A, Okuzaki D, Suzuki H, Torigata K, et al. N-terminal truncation of *Lats1* causes abnormal cell growth control and chromosomal instability. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 2):508-20.
226. Kim M, Kim M, Park SJ, Lee C, Lim DS. Role of Angiomotin-like 2 mono-ubiquitination on YAP inhibition. *EMBO Rep.* 2016;17(1):64-78.
227. Nishiyama Y, Hirota T, Morisaki T, Hara T, Marumoto T, Iida S, et al. A human homolog of *Drosophila* *warts* tumor suppressor, *h-warts*, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. *FEBS Lett.* 1999;459(2):159-65.
228. Sudol M. Newcomers to the WW Domain-Mediated Network of the Hippo Tumor Suppressor Pathway. *Genes Cancer.* 2010;1(11):1115-8.
229. Furth N, Aylon Y. The LATS1 and LATS2 tumor suppressors: beyond the Hippo pathway. *Cell Death Differ.* 2017;24(9):1488-501.
230. Yu T, Bachman J, Lai ZC. Mutation analysis of large tumor suppressor genes LATS1 and LATS2 supports a tumor suppressor role in human cancer. *Protein Cell.* 2015;6(1):6-11.
231. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet.* 2007;16 Spec No 1:R50-9.
232. Kostic C, Shaw PH. Isolation and characterization of sixteen novel p53 response genes. *Oncogene.* 2000;19(35):3978-87.
233. Aylon Y, Oren M. The Paradox of p53: What, How, and Why? *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(10).
234. Aylon Y, Michael D, Shmueli A, Yabuta N, Nojima H, Oren M. A positive feedback loop between the p53 and *Lats2* tumor suppressors prevents tetraploidization. *Genes Dev.* 2006;20(19):2687-700.
235. Park GS, Oh H, Kim M, Kim T, Johnson RL, Irvine KD, et al. An evolutionarily conserved negative feedback mechanism in the Hippo pathway reflects functional difference between LATS1 and LATS2. *Oncotarget.* 2016;7(17):24063-75.
236. Chen Q, Zhang N, Xie R, Wang W, Cai J, Choi KS, et al. Homeostatic control of Hippo signaling activity revealed by an endogenous activating mutation in YAP. *Genes Dev.* 2015;29(12):1285-97.
237. Fang L, Du WW, Yang W, Rutnam ZJ, Peng C, Li H, et al. MiR-93 enhances angiogenesis and metastasis by targeting LATS2. *Cell Cycle.* 2012;11(23):4352-65.
238. Hoa L, Kulaberoglu Y, Gundogdu R, Cook D, Mavis M, Gomez M, et al. The characterisation of LATS2 kinase regulation in Hippo-YAP signalling. *Cell Signal.* 2016;28(5):488-97.
239. Zhou D, Conrad C, Xia F, Park JS, Payer B, Yin Y, et al. Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the *Yap1* oncogene. *Cancer Cell.* 2009;16(5):425-38.
240. Li Q, Li S, Mana-Capelli S, Roth Flach RJ, Danai LV, Amcheslavsky A, et al. The conserved misshapen-warts-Yorkie pathway acts in enteroblasts to regulate intestinal stem cells in *Drosophila*. *Dev Cell.* 2014;31(3):291-304.
241. Li S, Cho YS, Yue T, Ip YT, Jiang J. Overlapping functions of the MAP4K family kinases *Hppy* and *Msn* in Hippo signaling. *Cell Discov.* 2015;1:15038.
242. Meng Z, Moroishi T, Mottier-Pavie V, Plouffe SW, Hansen CG, Hong AW, et al. MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. *Nat Commun.* 2015;6:8357.
243. Plouffe SW, Meng Z, Lin KC, Lin B, Hong AW, Chun JV, et al. Characterization of Hippo Pathway Components by Gene Inactivation. *Mol Cell.* 2016;64(5):993-1008.

244. Okada N, Yabuta N, Suzuki H, Aylon Y, Oren M, Nojima H. A novel Chk1/2-Lats2-14-3-3 signaling pathway regulates P-body formation in response to UV damage. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 1):57-67.
245. Tao W, Zhang S, Turenchalk GS, Stewart RA, St John MA, Chen W, et al. Human homologue of the *Drosophila melanogaster* lats tumour suppressor modulates CDC2 activity. *Nat Genet.* 1999;21(2):177-81.
246. Toji S, Yabuta N, Hosomi T, Nishihara S, Kobayashi T, Suzuki S, et al. The centrosomal protein Lats2 is a phosphorylation target of Aurora-A kinase. *Genes Cells.* 2004;9(5):383-97.
247. Humbert N, Navaratnam N, Augert A, Da Costa M, Martien S, Wang J, et al. Regulation of ploidy and senescence by the AMPK-related kinase NUA1. *EMBO J.* 2010;29(2):376-86.
248. Xiao L, Chen Y, Ji M, Dong J. KIBRA regulates Hippo signaling activity via interactions with large tumor suppressor kinases. *J Biol Chem.* 2011;286(10):7788-96.
249. Salah Z, Cohen S, Itzhaki E, Aqeilan RI. NEDD4 E3 ligase inhibits the activity of the Hippo pathway by targeting LATS1 for degradation. *Cell Cycle.* 2013;12(24):3817-23.
250. Ho KC, Zhou Z, She YM, Chun A, Cyr TD, Yang X. Itch E3 ubiquitin ligase regulates large tumor suppressor 1 stability [corrected]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(12):4870-5.
251. Salah Z, Melino G, Aqeilan RI. Negative regulation of the Hippo pathway by E3 ubiquitin ligase ITCH is sufficient to promote tumorigenicity. *Cancer Res.* 2011;71(5):2010-20.
252. Yeung B, Ho KC, Yang X. WWP1 E3 ligase targets LATS1 for ubiquitin-mediated degradation in breast cancer cells. *PLoS One.* 2013;8(4):e61027.
253. Aylon Y, Ofir-Rosenfeld Y, Yabuta N, Lapi E, Nojima H, Lu X, et al. The Lats2 tumor suppressor augments p53-mediated apoptosis by promoting the nuclear proapoptotic function of ASPP1. *Genes Dev.* 2010;24(21):2420-9.
254. Li Y, Pei J, Xia H, Ke H, Wang H, Tao W. Lats2, a putative tumor suppressor, inhibits G1/S transition. *Oncogene.* 2003;22(28):4398-405.
255. Pefani DE, Latusek R, Pires I, Grawenda AM, Yee KS, Hamilton G, et al. RASSF1A-LATS1 signalling stabilizes replication forks by restricting CDK2-mediated phosphorylation of BRCA2. *Nat Cell Biol.* 2014;16(10):962-71, 1-8.
256. Xia H, Qi H, Li Y, Pei J, Barton J, Blackstad M, et al. LATS1 tumor suppressor regulates G2/M transition and apoptosis. *Oncogene.* 2002;21(8):1233-41.
257. Ke H, Pei J, Ni Z, Xia H, Qi H, Woods T, et al. Putative tumor suppressor Lats2 induces apoptosis through downregulation of Bcl-2 and Bcl-x(L). *Exp Cell Res.* 2004;298(2):329-38.
258. Moroishi T, Hansen CG, Guan KL. The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(2):73-9.
259. Torigata K, Daisuke O, Mukai S, Hatanaka A, Ohka F, Motooka D, et al. LATS2 Positively Regulates Polycomb Repressive Complex 2. *PLoS One.* 2016;11(7):e0158562.
260. Powzaniuk M, McElwee-Witmer S, Vogel RL, Hayami T, Rutledge SJ, Chen F, et al. The LATS2/KPM tumor suppressor is a negative regulator of the androgen receptor. *Mol Endocrinol.* 2004;18(8):2011-23.
261. Lit LC, Scott S, Zhang H, Stebbing J, Photiou A, Giamas G. LATS2 is a modulator of estrogen receptor alpha. *Anticancer Res.* 2013;33(1):53-63.
262. Britschgi A, Duss S, Kim S, Couto JP, Brinkhaus H, Koren S, et al. The Hippo kinases LATS1 and 2 control human breast cell fate via crosstalk with ERalpha. *Nature.* 2017;541(7638):541-5.
263. Sudol M. Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product. *Oncogene.* 1994;9(8):2145-52.
264. Kanai F, Marignani PA, Sarbassova D, Yagi R, Hall RA, Donowitz M, et al. TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *EMBO J.* 2000;19(24):6778-91.
265. Gaffney CJ, Oka T, Mazack V, Hilman D, Gat U, Muramatsu T, et al. Identification, basic characterization and evolutionary analysis of differentially spliced mRNA isoforms of human YAP1 gene. *Gene.* 2012;509(2):215-22.

266. Kodaka M, Hata Y. The mammalian Hippo pathway: regulation and function of YAP1 and TAZ. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(2):285-306.
267. Wu H, Xiao Y, Zhang S, Ji S, Wei L, Fan F, et al. The Ets transcription factor GABP is a component of the hippo pathway essential for growth and antioxidant defense. *Cell Rep.* 2013;3(5):1663-77.
268. Seo E, Basu-Roy U, Gunaratne PH, Coarfa C, Lim DS, Basilico C, et al. SOX2 regulates YAP1 to maintain stemness and determine cell fate in the osteo-adipo lineage. *Cell Rep.* 2013;3(6):2075-87.
269. Lei QY, Zhang H, Zhao B, Zha ZY, Bai F, Pei XH, et al. TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Mol Cell Biol.* 2008;28(7):2426-36.
270. Basu S, Totty NF, Irwin MS, Sudol M, Downward J. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell.* 2003;11(1):11-23.
271. Rosenbluh J, Nijhawan D, Cox AG, Li X, Neal JT, Schafer EJ, et al. beta-Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell.* 2012;151(7):1457-73.
272. Yang S, Zhang L, Liu M, Chong R, Ding SJ, Chen Y, et al. CDK1 phosphorylation of YAP promotes mitotic defects and cell motility and is essential for neoplastic transformation. *Cancer Res.* 2013;73(22):6722-33.
273. Liu CY, Lv X, Li T, Xu Y, Zhou X, Zhao S, et al. PP1 cooperates with ASPP2 to dephosphorylate and activate TAZ. *J Biol Chem.* 2011;286(7):5558-66.
274. Cai H, Xu Y. The role of LPA and YAP signaling in long-term migration of human ovarian cancer cells. *Cell Commun Signal.* 2013;11(1):31.
275. Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, Hooper S, Jenkins RP, Chaudhry SI, et al. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 2013;15(6):637-46.
276. Cordenonsi M, Zanconato F, Azzolin L, Forcato M, Rosato A, Frasson C, et al. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell.* 2011;147(4):759-72.
277. Taylor LK, Wang HC, Erikson RL. Newly identified stress-responsive protein kinases, Krs-1 and Krs-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(19):10099-104.
278. Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, Yang Y, Villen J, Becker EB, et al. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell.* 2006;125(5):987-1001.
279. DeRan M, Yang J, Shen CH, Peters EC, Fitamant J, Chan P, et al. Energy stress regulates hippo-YAP signaling involving AMPK-mediated regulation of angiomin-1 protein. *Cell Rep.* 2014;9(2):495-503.
280. Wehr MC, Holder MV, Gailite I, Saunders RE, Maile TM, Ciirdaeva E, et al. Salt-inducible kinases regulate growth through the Hippo signalling pathway in *Drosophila*. *Nat Cell Biol.* 2013;15(1):61-71.
281. Sorrentino G, Ruggeri N, Specchia V, Cordenonsi M, Mano M, Dupont S, et al. Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nat Cell Biol.* 2014;16(4):357-66.
282. Hong AW, Meng Z, Yuan HX, Plouffe SW, Moon S, Kim W, et al. Osmotic stress-induced phosphorylation by NLK at Ser128 activates YAP. *EMBO Rep.* 2017;18(1):72-86.
283. Ma B, Chen Y, Chen L, Cheng H, Mu C, Li J, et al. Hypoxia regulates Hippo signalling through the SIAH2 ubiquitin E3 ligase. *Nat Cell Biol.* 2015;17(1):95-103.
284. Rodriguez-Boulant E, Macara IG. Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(4):225-42.
285. Camargo FD, Gokhale S, Johnnidis JB, Fu D, Bell GW, Jaenisch R, et al. YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. *Curr Biol.* 2007;17(23):2054-60.
286. Cai J, Zhang N, Zheng Y, de Wilde RF, Maitra A, Pan D. The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes Dev.* 2010;24(21):2383-8.
287. Lallemand D, Curto M, Saotome I, Giovannini M, McClatchey AI. NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. *Genes Dev.* 2003;17(9):1090-100.

288. Stokowski RP, Cox DR. Functional analysis of the neurofibromatosis type 2 protein by means of disease-causing point mutations. *Am J Hum Genet.* 2000;66(3):873-91.
289. Yi C, Troutman S, Fera D, Stemmer-Rachamimov A, Avila JL, Christian N, et al. A tight junction-associated Merlin-angiomotin complex mediates Merlin's regulation of mitogenic signaling and tumor suppressive functions. *Cancer Cell.* 2011;19(4):527-40.
290. Genevet A, Wehr MC, Brain R, Thompson BJ, Tapon N. Kibra is a regulator of the Salvador/Warts/Hippo signaling network. *Dev Cell.* 2010;18(2):300-8.
291. Moleirinho S, Chang N, Sims AH, Tilston-Lunel AM, Angus L, Steele A, et al. KIBRA exhibits MST-independent functional regulation of the Hippo signaling pathway in mammals. *Oncogene.* 2013;32(14):1821-30.
292. Yin F, Yu J, Zheng Y, Chen Q, Zhang N, Pan D. Spatial organization of Hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor Merlin/NF2. *Cell.* 2013;154(6):1342-55.
293. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
294. Schlegelmilch K, Mohseni M, Kirak O, Pruszk J, Rodriguez JR, Zhou D, et al. Yap1 acts downstream of alpha-catenin to control epidermal proliferation. *Cell.* 2011;144(5):782-95.
295. Silvis MR, Kreger BT, Lien WH, Klezovitch O, Rudakova GM, Camargo FD, et al. alpha-catenin is a tumor suppressor that controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator Yap1. *Sci Signal.* 2011;4(174):ra33.
296. Varelas X, Samavarchi-Tehrani P, Narimatsu M, Weiss A, Cockburn K, Larsen BG, et al. The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF-beta-SMAD pathway. *Dev Cell.* 2010;19(6):831-44.
297. Bossuyt W, Chen CL, Chen Q, Sudol M, McNeill H, Pan D, et al. An evolutionary shift in the regulation of the Hippo pathway between mice and flies. *Oncogene.* 2014;33(10):1218-28.
298. Chan SW, Lim CJ, Chong YF, Pobbati AV, Huang C, Hong W. Hippo pathway-independent restriction of TAZ and YAP by angiomotin. *J Biol Chem.* 2011;286(9):7018-26.
299. Oka T, Schmitt AP, Sudol M. Opposing roles of angiomotin-like-1 and zona occludens-2 on pro-apoptotic function of YAP. *Oncogene.* 2012;31(1):128-34.
300. Zhao B, Li L, Lu Q, Wang LH, Liu CY, Lei Q, et al. Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes Dev.* 2011;25(1):51-63.
301. Wang W, Huang J, Chen J. Angiomotin-like proteins associate with and negatively regulate YAP1. *J Biol Chem.* 2011;286(6):4364-70.
302. Yi C, Shen Z, Stemmer-Rachamimov A, Dawany N, Troutman S, Showe LC, et al. The p130 isoform of angiomotin is required for Yap-mediated hepatic epithelial cell proliferation and tumorigenesis. *Sci Signal.* 2013;6(291):ra77.
303. Yang S, Zhang L, Chen X, Chen Y, Dong J. Oncoprotein YAP regulates the spindle checkpoint activation in a mitotic phosphorylation-dependent manner through up-regulation of BubR1. *J Biol Chem.* 2015;290(10):6191-202.
304. Zhao Y, Khanal P, Savage P, She YM, Cyr TD, Yang X. YAP-induced resistance of cancer cells to antitubulin drugs is modulated by a Hippo-independent pathway. *Cancer Res.* 2014;74(16):4493-503.
305. Dent LG, Poon CL, Zhang X, Degoutin JL, Tipping M, Veraksa A, et al. The GTPase regulatory proteins Pix and Git control tissue growth via the Hippo pathway. *Curr Biol.* 2015;25(1):124-30.
306. Ma S, Meng Z, Chen R, Guan KL. The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. *Annu Rev Biochem.* 2019;88:577-604.
307. Zhou X, Wang S, Wang Z, Feng X, Liu P, Lv XB, et al. Estrogen regulates Hippo signaling via GPER in breast cancer. *J Clin Invest.* 2015;125(5):2123-35.
308. Yu FX, Luo J, Mo JS, Liu G, Kim YC, Meng Z, et al. Mutant Gq/11 promote uveal melanoma tumorigenesis by activating YAP. *Cancer Cell.* 2014;25(6):822-30.

309. Yu FX, Zhao B, Panupinthu N, Jewell JL, Lian I, Wang LH, et al. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell*. 2012;150(4):780-91.
310. Azad T, Janse van Rensburg HJ, Lightbody ED, Neveu B, Champagne A, Ghaffari A, et al. A LATS biosensor screen identifies VEGFR as a regulator of the Hippo pathway in angiogenesis. *Nat Commun*. 2018;9(1):1061.
311. Miranda MZ, Bialik JF, Speight P, Dan Q, Yeung T, Szaszi K, et al. TGF-beta1 regulates the expression and transcriptional activity of TAZ protein via a Smad3-independent, myocardin-related transcription factor-mediated mechanism. *J Biol Chem*. 2017;292(36):14902-20.
312. Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*. 2011;474(7350):179-83.
313. Aragona M, Panciera T, Manfrin A, Giulitti S, Michielin F, Elvassore N, et al. A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell*. 2013;154(5):1047-59.
314. Zhao B, Li L, Wang L, Wang CY, Yu J, Guan KL. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev*. 2012;26(1):54-68.
315. Ota M, Sasaki H. Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development*. 2008;135(24):4059-69.
316. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006;127(3):469-80.
317. Niehrs C, Acebron SP. Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *EMBO J*. 2012;31(12):2705-13.
318. Azzolin L, Panciera T, Soligo S, Enzo E, Bicciato S, Dupont S, et al. YAP/TAZ incorporation in the beta-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell*. 2014;158(1):157-70.
319. Azzolin L, Zanconato F, Bresolin S, Forcato M, Basso G, Bicciato S, et al. Role of TAZ as mediator of Wnt signaling. *Cell*. 2012;151(7):1443-56.
320. Varelas X, Miller BW, Sopko R, Song S, Gregorieff A, Fellouse FA, et al. The Hippo pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Dev Cell*. 2010;18(4):579-91.
321. Li J, Chen X, Ding X, Cheng Y, Zhao B, Lai ZC, et al. LATS2 suppresses oncogenic Wnt signaling by disrupting beta-catenin/BCL9 interaction. *Cell Rep*. 2013;5(6):1650-63.
322. Heallen T, Zhang M, Wang J, Bonilla-Claudio M, Klysik E, Johnson RL, et al. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science*. 2011;332(6028):458-61.
323. Mauviel A, Nallet-Staub F, Varelas X. Integrating developmental signals: a Hippo in the (path)way. *Oncogene*. 2012;31(14):1743-56.
324. Massague J. TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(10):616-30.
325. Perrot CY, Javelaud D, Mauviel A. Overlapping activities of TGF-beta and Hedgehog signaling in cancer: therapeutic targets for cancer treatment. *Pharmacol Ther*. 2013;137(2):183-99.
326. Gencer S, Oleinik N, Kim J, Panneer Selvam S, De Palma R, Dany M, et al. TGF-beta receptor I/II trafficking and signaling at primary cilia are inhibited by ceramide to attenuate cell migration and tumor metastasis. *Sci Signal*. 2017;10(502).
327. Tian X, Guan W, Zhang L, Sun W, Zhou D, Lin Q, et al. Physical interaction of STAT1 isoforms with TGF-beta receptors leads to functional crosstalk between two signaling pathways in epithelial ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):103.
328. Wang Y, Chu J, Yi P, Dong W, Saultz J, Wang Y, et al. SMAD4 promotes TGF-beta-independent NK cell homeostasis and maturation and antitumor immunity. *J Clin Invest*. 2018;128(11):5123-36.
329. Jonk LJ, Itoh S, Heldin CH, ten Dijke P, Kruijjer W. Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *J Biol Chem*. 1998;273(33):21145-52.
330. Shi W, Sun C, He B, Xiong W, Shi X, Yao D, et al. GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J Cell Biol*. 2004;164(2):291-300.

331. Janknecht R, Wells NJ, Hunter T. TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300. *Genes Dev.* 1998;12(14):2114-9.
332. Luo K, Stroschein SL, Wang W, Chen D, Martens E, Zhou S, et al. The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling. *Genes Dev.* 1999;13(17):2196-206.
333. Ben Mimoun S, Mauviel A. Molecular mechanisms underlying TGF-ss/Hippo signaling crosstalks - Role of baso-apical epithelial cell polarity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018;98:75-81.
334. Aragon E, Goerner N, Xi Q, Gomes T, Gao S, Massague J, et al. Structural basis for the versatile interactions of Smad7 with regulator WW domains in TGF-beta Pathways. *Structure.* 2012;20(10):1726-36.
335. Varelas X, Sakuma R, Samavarchi-Tehrani P, Peerani R, Rao BM, Dembowy J, et al. TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nat Cell Biol.* 2008;10(7):837-48.
336. Nallet-Staub F, Yin X, Gilbert C, Marsaud V, Ben Mimoun S, Javelaud D, et al. Cell density sensing alters TGF-beta signaling in a cell-type-specific manner, independent from Hippo pathway activation. *Dev Cell.* 2015;32(5):640-51.
337. Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis--A Common Pathway to Organ Injury and Failure. *N Engl J Med.* 2015;373(1):96.
338. Piersma B, Bank RA, Boersema M. Signaling in Fibrosis: TGF-beta, WNT, and YAP/TAZ Converge. *Front Med (Lausanne).* 2015;2:59.
339. Desmouliere A, Tuchweber B, Gabbiani G. Role of the myofibroblast differentiation during liver fibrosis. *J Hepatol.* 1995;22(2 Suppl):61-4.
340. Carthy JM, Garmaroudi FS, Luo Z, McManus BM. Wnt3a induces myofibroblast differentiation by upregulating TGF-beta signaling through SMAD2 in a beta-catenin-dependent manner. *PLoS One.* 2011;6(5):e19809.
341. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, Bergmann C, Venalis P, Zerr P, et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF-beta-mediated fibrosis. *Nat Commun.* 2012;3:735.
342. Furuhashi M, Yagi K, Yamamoto H, Furukawa Y, Shimada S, Nakamura Y, et al. Axin facilitates Smad3 activation in the transforming growth factor beta signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 2001;21(15):5132-41.
343. Fujii M, Nakanishi H, Toyoda T, Tanaka I, Kondo Y, Osada H, et al. Convergent signaling in the regulation of connective tissue growth factor in malignant mesothelioma: TGFbeta signaling and defects in the Hippo signaling cascade. *Cell Cycle.* 2012;11(18):3373-9.
344. Zhou B, Liu Y, Kahn M, Ann DK, Han A, Wang H, et al. Interactions between beta-catenin and transforming growth factor-beta signaling pathways mediate epithelial-mesenchymal transition and are dependent on the transcriptional co-activator cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP). *J Biol Chem.* 2012;287(10):7026-38.
345. Labbe E, Lock L, Letamendia A, Gorska AE, Gryfe R, Gallinger S, et al. Transcriptional cooperation between the transforming growth factor-beta and Wnt pathways in mammary and intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* 2007;67(1):75-84.
346. Fernandez LA, Northcott PA, Dalton J, Fraga C, Ellison D, Angers S, et al. YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation. *Genes Dev.* 2009;23(23):2729-41.
347. Jang SW, Yang SJ, Srinivasan S, Ye K. Akt phosphorylates Mst1 and prevents its proteolytic activation, blocking FOXO3 phosphorylation and nuclear translocation. *J Biol Chem.* 2007;282(42):30836-44.
348. Matallanas D, Romano D, Yee K, Meissl K, Kucerova L, Piazzolla D, et al. RASSF1A elicits apoptosis through an MST2 pathway directing proapoptotic transcription by the p73 tumor suppressor protein. *Mol Cell.* 2007;27(6):962-75.

349. Vigneron AM, Ludwig RL, Vousden KH. Cytoplasmic ASPP1 inhibits apoptosis through the control of YAP. *Genes Dev.* 2010;24(21):2430-9.
350. Bao XM, He Q, Wang Y, Huang ZH, Yuan ZQ. The roles and mechanisms of the Hippo/YAP signaling pathway in the nervous system. *Yi Chuan.* 2017;39(7):630-41.
351. Lin C, Yao E, Chuang PT. A conserved MST1/2-YAP axis mediates Hippo signaling during lung growth. *Dev Biol.* 2015;403(1):101-13.
352. Lange AW, Sridharan A, Xu Y, Stripp BR, Perl AK, Whitsett JA. Hippo/Yap signaling controls epithelial progenitor cell proliferation and differentiation in the embryonic and adult lung. *J Mol Cell Biol.* 2015;7(1):35-47.
353. Mahoney JE, Mori M, Szymaniak AD, Varelas X, Cardoso WV. The hippo pathway effector Yap controls patterning and differentiation of airway epithelial progenitors. *Dev Cell.* 2014;30(2):137-50.
354. Zhao R, Fallon TR, Saladi SV, Pardo-Saganta A, Villoria J, Mou H, et al. Yap tunes airway epithelial size and architecture by regulating the identity, maintenance, and self-renewal of stem cells. *Dev Cell.* 2014;30(2):151-65.
355. Watt KI, Turner BJ, Hagg A, Zhang X, Davey JR, Qian H, et al. The Hippo pathway effector YAP is a critical regulator of skeletal muscle fibre size. *Nat Commun.* 2015;6:6048.
356. Watt KI, Goodman CA, Hornberger TA, Gregorevic P. The Hippo Signaling Pathway in the Regulation of Skeletal Muscle Mass and Function. *Exerc Sport Sci Rev.* 2018;46(2):92-6.
357. von Gise A, Lin Z, Schlegelmilch K, Honor LB, Pan GM, Buck JN, et al. YAP1, the nuclear target of Hippo signaling, stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(7):2394-9.
358. Heallen T, Morikawa Y, Leach J, Tao G, Willerson JT, Johnson RL, et al. Hippo signaling impedes adult heart regeneration. *Development.* 2013;140(23):4683-90.
359. Yu FX, Meng Z, Plouffe SW, Guan KL. Hippo pathway regulation of gastrointestinal tissues. *Annu Rev Physiol.* 2015;77:201-27.
360. Yi J, Lu L, Yanger K, Wang W, Sohn BH, Stanger BZ, et al. Large tumor suppressor homologs 1 and 2 regulate mouse liver progenitor cell proliferation and maturation through antagonism of the coactivators YAP and TAZ. *Hepatology.* 2016;64(5):1757-72.
361. Sharma A, Yerra VG, Kumar A. Emerging role of Hippo signalling in pancreatic biology: YAP re-expression and plausible link to islet cell apoptosis and replication. *Biochimie.* 2017;133:56-65.
362. Reginensi A, Scott RP, Gregorieff A, Bagherie-Lachidan M, Chung C, Lim DS, et al. Yap- and Cdc42-dependent nephrogenesis and morphogenesis during mouse kidney development. *PLoS Genet.* 2013;9(3):e1003380.
363. Makita R, Uchijima Y, Nishiyama K, Amano T, Chen Q, Takeuchi T, et al. Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294(3):F542-53.
364. McNeill H, Reginensi A. Lats1/2 Regulate Yap/Taz to Control Nephron Progenitor Epithelialization and Inhibit Myofibroblast Formation. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(3):852-61.
365. Shi P, Feng J, Chen C. Hippo pathway in mammary gland development and breast cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2015;47(1):53-9.
366. Kwon HJ, Li L, Jung HS. Hippo pathway/Yap regulates primary enamel knot and dental cusp patterning in tooth morphogenesis. *Cell Tissue Res.* 2015;362(2):447-51.
367. Sen Sharma S, Majumdar SS. Transcriptional co-activator YAP regulates cAMP signaling in Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;450:64-73.
368. Levasseur A, Paquet M, Boerboom D, Boyer A. Yes-associated protein and WW-containing transcription regulator 1 regulate the expression of sex-determining genes in Sertoli cells, but their inactivation does not cause sex reversal. *Biol Reprod.* 2017;97(1):162-75.

369. Maas K, Mirabal S, Penzias A, Sweetnam PM, Eggan KC, Sakkas D. Hippo signaling in the ovary and polycystic ovarian syndrome. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(10):1763-71.
370. Levasseur A, St-Jean G, Paquet M, Boerboom D, Boyer A. Targeted Disruption of YAP and TAZ Impairs the Maintenance of the Adrenal Cortex. *Endocrinology.* 2017;158(11):3738-53.
371. Abduch RH, Carolina Bueno A, Leal LF, Cavalcanti MM, Gomes DC, Brandalise SR, et al. Unraveling the expression of the oncogene YAP1, a Wnt/beta-catenin target, in adrenocortical tumors and its association with poor outcome in pediatric patients. *Oncotarget.* 2016;7(51):84634-44.
372. Narumi S. Rare monogenic causes of primary adrenal insufficiency. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2018;25(3):172-7.
373. Muscatelli F, Strom TM, Walker AP, Zanaria E, Recan D, Meindl A, et al. Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature.* 1994;372(6507):672-6.
374. Suntharalingham JP, Buonocore F, Duncan AJ, Achermann JC. DAX-1 (NROB1) and steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) in human disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015;29(4):607-19.
375. Ferraz-de-Souza B, Lin L, Achermann JC. Steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and human disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;336(1-2):198-205.
376. Narumi S, Amano N, Ishii T, Katsumata N, Muroya K, Adachi M, et al. SAMD9 mutations cause a novel multisystem disorder, MIRAGE syndrome, and are associated with loss of chromosome 7. *Nat Genet.* 2016;48(7):792-7.
377. Vilain E, Le Merrer M, Lecointre C, Desangles F, Kay MA, Maroteaux P, et al. IMAGE, a new clinical association of intrauterine growth retardation, metaphyseal dysplasia, adrenal hypoplasia congenita, and genital anomalies. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(12):4335-40.
378. Arboleda VA, Lee H, Parnaik R, Fleming A, Banerjee A, Ferraz-de-Souza B, et al. Mutations in the PCNA-binding domain of CDKN1C cause IMAGE syndrome. *Nat Genet.* 2012;44(7):788-92.
379. Chan SW, Lim CJ, Guo K, Ng CP, Lee I, Hunziker W, et al. A role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cancer Res.* 2008;68(8):2592-8.
380. Huang CC, Liu C, Yao HH. Investigating the role of adrenal cortex in organization and differentiation of the adrenal medulla in mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;361(1-2):165-71.
381. Molinoff PB, Axelrod J. Biochemistry of catecholamines. *Annu Rev Biochem.* 1971;40:465-500.
382. Lodge EJ, Santambrogio A, Russell JP, Xekouki P, Jacques TS, Johnson RL, et al. Homeostatic and tumorigenic activity of SOX2+ pituitary stem cells is controlled by the LATS/YAP/TAZ cascade. *Elife.* 2019;8.
383. Rueda EM, Hall BM, Hill MC, Swinton PG, Tong X, Martin JF, et al. The Hippo Pathway Blocks Mammalian Retinal Muller Glial Cell Reprogramming. *Cell Rep.* 2019;27(6):1637-49 e6.
384. Choi W, Kim J, Park J, Lee DH, Hwang D, Kim JH, et al. YAP/TAZ Initiates Gastric Tumorigenesis via Upregulation of MYC. *Cancer Res.* 2018;78(12):3306-20.
385. Xiao Y, Hill MC, Li L, Deshmukh V, Martin TJ, Wang J, et al. Hippo pathway deletion in adult resting cardiac fibroblasts initiates a cell state transition with spontaneous and self-sustaining fibrosis. *Genes Dev.* 2019;33(21-22):1491-505.
386. McPherson JP, Tamblyn L, Elia A, Migon E, Shehabeldin A, Matysiak-Zablocki E, et al. Lats2/Kpm is required for embryonic development, proliferation control and genomic integrity. *EMBO J.* 2004;23(18):3677-88.
387. Wang Y, Jindal S, Martel M, Wu Y, Schedin P, Troxell M. Myoepithelial cells in lobular carcinoma in situ: distribution and immunophenotype. *Hum Pathol.* 2016;55:126-34.
388. Eyden B. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med.* 2008;12(1):22-37.

389. Tajima T, Ma XM, Bornstein SR, Aguilera G. Prenatal dexamethasone treatment does not prevent alterations of the hypothalamic pituitary adrenal axis in steroid 21-hydroxylase deficient mice. *Endocrinology*. 1999;140(7):3354-62.
390. Shiroishi T, Sagai T, Natsuume-Sakai S, Moriwaki K. Lethal deletion of the complement component C4 and steroid 21-hydroxylase genes in the mouse H-2 class III region, caused by meiotic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(9):2819-23.
391. Schonig K, Bujard H. Generating conditional mouse mutants via tetracycline-controlled gene expression. *Methods Mol Biol*. 2003;209:69-104.
392. Gannon AL, O'Hara L, Mason JI, Jorgensen A, Frederiksen H, Milne L, et al. Androgen receptor signalling in the male adrenal facilitates X-zone regression, cell turnover and protects against adrenal degeneration during ageing. *Sci Rep*. 2019;9(1):10457.
393. Crocoll A, Zhu CC, Cato AC, Blum M. Expression of androgen receptor mRNA during mouse embryogenesis. *Mech Dev*. 1998;72(1-2):175-8.
394. Kaludjerovic J, Ward WE. The Interplay between Estrogen and Fetal Adrenal Cortex. *J Nutr Metab*. 2012;2012:837901.
395. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-8.
396. Campbell S, Otis M, Cote M, Gallo-Payet N, Payet MD. Connection between integrins and cell activation in rat adrenal glomerulosa cells: a role for Arg-Gly-Asp peptide in the activation of the p42/p44(mapk) pathway and intracellular calcium. *Endocrinology*. 2003;144(4):1486-95.
397. Otis M, Campbell S, Payet MD, Gallo-Payet N. Expression of extracellular matrix proteins and integrins in rat adrenal gland: importance for ACTH-associated functions. *J Endocrinol*. 2007;193(3):331-47.
398. Virtanen I, Korhonen M, Petajaniemi N, Karhunen T, Thornell LE, Sorokin LM, et al. Laminin isoforms in fetal and adult human adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(10):4960-6.
399. Miettinen M, Lehto VP, Virtanen I. Immunofluorescence microscopic evaluation of the intermediate filament expression of the adrenal cortex and medulla and their tumors. *Am J Pathol*. 1985;118(3):360-6.
400. Grande MT, Sanchez-Laorden B, Lopez-Blau C, De Frutos CA, Boutet A, Arevalo M, et al. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat Med*. 2015;21(9):989-97.
401. Biswas H, Longmore GD. Action of SNAIL1 in Cardiac Myofibroblasts Is Important for Cardiac Fibrosis following Hypoxic Injury. *PLoS One*. 2016;11(10):e0162636.
402. Scarpa M, Grillo AR, Brun P, Macchi V, Stefani A, Signori S, et al. Snail1 transcription factor is a critical mediator of hepatic stellate cell activation following hepatic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300(2):G316-26.
403. Zhao X, Sun J, Su W, Shan H, Zhang B, Wang Y, et al. Melatonin Protects against Lung Fibrosis by Regulating the Hippo/YAP Pathway. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4).
404. Liu F, Lagares D, Choi KM, Stopfer L, Marinkovic A, Vrbanac V, et al. Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;308(4):L344-57.
405. Mannaerts I, Leite SB, Verhulst S, Claerhout S, Eysackers N, Thoen LF, et al. The Hippo pathway effector YAP controls mouse hepatic stellate cell activation. *J Hepatol*. 2015;63(3):679-88.
406. Ramakrishnan AB, Cadigan KM. Wnt target genes and where to find them. *F1000Res*. 2017;6:746.
407. Yang YC, Piek E, Zavadil J, Liang D, Xie D, Heyer J, et al. Hierarchical model of gene regulation by transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(18):10269-74.
408. Hiemer SE, Szymaniak AD, Varelas X. The transcriptional regulators TAZ and YAP direct transforming growth factor beta-induced tumorigenic phenotypes in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2014;289(19):13461-74.

409. St-Jean G, Tsoi M, Abedini A, Levasseur A, Rico C, Morin M, et al. Lats1 and Lats2 are required for the maintenance of multipotency in the Mullerian duct mesenchyme. *Development*. 2019;146(20).
410. Garrett Q, Khaw PT, Blalock TD, Schultz GS, Grotendorst GR, Daniels JT. Involvement of CTGF in TGF-beta1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(4):1109-16.
411. Lipson KE, Wong C, Teng Y, Spong S. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(Suppl 1):S24.